ÜBER DIE REAKTION IRIDOIDER INHALTSSTOFFE VON OLEA EUROPAEA L. MIT AMINEN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
Frankfurt am Main

von
DOROTHEE HELMECKE
aus Essen

Frankfurt am Main ~~1984~~ 1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538120_0016

ÜBER DIE REAKTION IRIDOIDER INHALTSSTOFFE VON OLEA EUROPAEA L. MIT AMINEN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
Frankfurt am Main

von
DOROTHEE HELMECKE
aus Essen

Frankfurt am Main 1984

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

Dekan:	Prof. Dr. H. Linde
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Schneider
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Linde
Tag der Promotion:	13.02.1985

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINFÜHRUNG	1
1.1	Herkunft und Bedeutung von Olea europaea L.	1
1.2	Botanik von Olea europaea L.	2
1.3	Inhaltsstoffe der Blätter	2
1.4	Wirkung und Anwendung von Blattextrakten	4
1.5	Zu Beginn der Arbeit vorliegende Untersuchungen	6
1.6	Problemstellung	9
2.	REAKTIONSPRODUKTE GEREINIGTER OLEA-EXTRAKTE MIT PRIMÄREN AMINEN	10
2.1	Standardisierung der Verfahren zur Extraktbereitung und Verarbeitung der Droge	10
2.2	Standardisierung der Reaktiosbedingungen	10
2.3	Isolierung von Methyl-Oleamin	12
2.4	Eigenschaften und Identifizierung von Methyl-Oleamin	12
2.5	Reaktionsmechanismus zur Bildung von Methyl-Elenolactam	23
2.6	Versuche zur quantitativen Bestimmung von Methyl-Elenolactam	25
2.7	Versuch zur Reduktion von Methyl-Elenolactam	27
2.8	DC-Eigenschaften weiterer Elenolactam-Derivate	28
3.	UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG DES REAKTANDEN ZUR ELENOLACTAM-BILDUNG	31
3.1	Extraktfraktionierung durch Löslichkeitsversuche	31
3.2	Chromatographische Verfahren zur Extraktfraktionierung	32
3.2.1	Dünnschicht- und Säulenchromatographie	32

Seite

3.2.2 Reverse-Phase-Chromatographie 33
3.3 Versuche zur hydrolytischen Freisetzung des Reaktanden aus Olea-Extrakten 34
3.3.1 Hydrolyse unter Säure- bzw. Baseneinwirkung 35
3.3.2 Hydrolyse mit β-Glukosidase 37
3.4 Nachweis von Elenolid bzw. Elenolsäure in gereinigtem Olea-Extrakt 38
3.5 Isolierung von Elenolsäure durch Droplet-Counter-Current-Chromatographie 38
3.6 Versuche zur Ausbeute-Steigerung von Elenolsäure aus Olea-Extrakten 40
3.7 Versuche zur H^+-katalysierten Freisetzung von Elenolsäure aus Oleuropein 41
3.8 Versuche zur Hydrazon-Bildung der Elenolsäure 42
3.8.1 Umsetzung mit 2.4-Dinitrophenylhydrazin 42
3.8.2 Umsetzung mit Phenylhydrazin 43
3.8.3 Umsetzung mit p-Nitrophenylhydrazin 44

4. VERSUCHE ZUR PHOTOMETRISCHEN BESTIMMUNG DER ELENOLSÄURE

4.1 Bestimmung von Calcium-Elenolat 48
4.2 Bestimmung des Elenolsäure-Komplexes in Olea-Extrakten 51

5. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE OXIDANTIEN ZUR METHYL-ELENOLACTAM-BILDUNG 53

5.1 Versuche zum Typus der Enzymbeteiligung 53
5.2 Versuche zur Charakterisierung der zellgebundenen Olea-Oxidase 54
5.2.1 Hemmung durch Cyanid 54
5.2.2 Hemmung durch Natriumfluorid und -azid 57
5.2.3 Einfluß von Hydrazin auf die Bildung von Methyl-Elenolactam 57
5.3 Versuche zur Anreicherung der Olea-Oxidase 59

		Seite
6.	UNTERSUCHUNGEN ZUR KINETIK DER ELENOLACTAM-BILDUNG AUS ELENOLSÄURE UND METHYLAMIN	62
7.	ANHANG: NACHWEIS DER ELENOLSÄURE IN LIGUSTRUM VULGARE L.	65
8.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	66
9.	ZUSAMMENFASSUNG	81
10.	EXPERIMENTELLER TEIL	84
10.1	Extraktbereitung und Drogenstandardisierung	84
10.1.1	Herstellung von gereinigtem Olea-Extrakt	84
10.1.2	Herstellung von Extrakt zur Gewinnung der Elenolsäure	84
10.1.3	Aufbereitung der Droge und Gewinnung von Acetonpulver	85
10.2	Dünnschichtchromatographische Methoden	85
10.3	Methoden zum Nachweis und zur Gewinnung der Elenolactame	87
10.3.1	Methyl-Elenolactam	87
10.3.1.1	Standard-Reaktion zum Nachweis	87
10.3.1.2	Darstellung und Isolierung	87
10.3.1.3	Reduktion	89
10.3.1.4	Versuche zur quantitativen Bestimmung	89
10.3.2	Benzyl-Elenolactam	91
10.3.3	Andere Elenolactame	91
10.4	Methoden zum Nachweis und zur Gewinnung der Elenolsäure	91
10.4.1	Chromatographische Voruntersuchungen	91
10.4.2	Hydrolyse von gereinigtem Olea-Extrakt	93
10.4.3	Isolierung von Elenolsäure aus Olea-Extrakt	94
10.4.4	Gewinnung von Elenolsäure aus Oleuropein	95

		Seite
10.4.5	Bildung der Hydrazone	96
10.5	Versuche zur quantitativen Bestimmung von Elenolsäure-Komplex	97
10.6	Untersuchung der Wirksamkeit einzelner Oxidantien	99
10.6.1	Einsatz verschiedener Oxidantien	99
10.6.2	Untersuchungen zur Charakterisierung der Olea-Oxidase	99
10.6.3	Versuche zur Anreicherung der Olea-Oxidase	99
10.7	Untersuchungen zur Kinetik der Standard-Reaktion	100
10.8	Nachweis von Elenolsäure in Ligustrum vulgare L.	100
10.9	Physikalische Untersuchungsmethoden	100
11.	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN LITERATUR	102

1. EINFÜHRUNG

1.1 Herkunft und Bedeutung von Olea europaea L.

Olea europaea L. ist wohl eine der ältesten Kulturpflanzen überhaupt und dürfte bereits in vorgeschichtlicher Zeit eine bedeutende Rolle gespielt haben. Funde aus dem Tertiär weisen auf einen Ursprung in Südeuropa und dem Nahen Osten (FRANKE, RIKLI). Die Inkulturnahme liegt viele Jahrtausende zurück und erfolgte wahrscheinlich im subtropischen Teil des Mediterraneums. 5000 Jahre alte Vasenfunde auf Kreta mit darauf abgebildeten Ölbaumzweigen sowie Funde aus der Bronzezeit 2900-2700 v. Chr. aus dem östlichen Mittelmeerraum bezeugen die frühe Domestikation (BRÜCHER). Für die Mittelmeervölker der Antike war eine Lebensführung ohne den Ölbaum praktisch undenkbar, so daß er seit alters her sakrale Verehrung genoß (HEGI, DIERBACH). Der Baum galt als Symbol des Wohlstands und des Friedens, seit der Überlieferung nach die von Noah ausgesandte Taube mit einem Ölbaumblatt zurückkehrte (1 MOSE 8,11).
Der Ölbaum erreicht ein sehr hohes Alter und ist mit 700 - 800 Jahren Nutzzeit die langlebigste Kulturpflanze. Er gedeiht auf allen Unterlagen, bevorzugt jedoch durchlässigen, trockenen Boden. Für die Olivenkultur ist der erwärmungsfähige Kalkboden, wie er in den Küstenlandschaften des Mittelmeers verbreitet ist, besonders günstig. Zur Ausreifung der Früchte bedarf der Ölbaum einer längeren sommerlichen Trockenheit, da sie sonst minderwertig werden. Die Anforderung an milde, feuchte Winter und warme, trockene Sommer decken sich mit den klimatischen Verhältnissen des Mittelmeerbeckens.
Heute ist Olea europaea L. geradezu das Wahrzeichen der Mittelmeerländer. Sie ist "nicht nur der wertvollste Frucht- und Nutzbaum der Mittelmeerregion, sondern auch ihre wichtigste Leit- und Charakterpflanze" (RIKLI, BRÜCHER).

1.2 Botanik von Olea europaea L.

Der Ölbaum gehört zu der Familie der Oleaceae, die unter anderem auch die einheimischen Gattungen Forsythia, Fraxinus, Ligustrum und Syringa umfaßt. Innerhalb der Ordnung der Oleales bilden die Oleaceae die einzige Familie. Von den Inhaltsstoffen her lassen sich Beziehungen zu verschiedenen Familien der Ordnung Gentianales knüpfen (HEGNAUER). Olea europaea L. ist ein bis zu 20 m hoher Baum, der in Kultur auf einer Höhe von 6 bis 8 m gehalten wird. Nur in der Jugend ist der Stamm mit heller Rinde glatt und rund, alte Bäume weisen gedrehte, gespaltene und gerippte Stämme auf. Die Zweige sind vierkantig bis rundlich. Die immergrünen, gegenständigen, ledrigen Laubblätter sind ganzrandig und schmalelliptisch, sie laufen am Ende in einer Stachelspitze aus und sind beidseitig eingerollt. Auf der Oberseite sind sie dunkelgrün und fast kahl, auf der Unterseite schimmern sie silbrig durch schirmartige Schildhaare. Die unscheinbaren, weißen Blüten sind radiär gebaut und bilden blattachselständige traubige Blütenstände. Es werden einsamige pflaumenähnliche Steinfrüchte gebildet. Sie sind anfangs grün, bei der Reife schwarzblau gefärbt. Ausgehend von den Standortbedingungen gibt es eine kaum übersehbare Anzahl kultivierter Varietäten. Nicht zu verwechseln ist die Kulturform mit der Wildform Olea oleaster Hoffm. et Link, die einen sparrigen Strauch oder einen kleinen Baum mit scharfkantigen und hartdornigen Zweigen darstellt. Die Blätter sind kleiner und breiter als die der Kulturpflanze, die Früchte sind klein und ölarm (BRÜCHER, FRANKE, HEGI, RIKLI).

1.3 Inhaltsstoffe der Blätter

Bereits Anfang des 19. Jahrhunderts fanden Ölbaumblätter vor allem ihrer bitteren Bestandteile wegen großes Interesse. Untersuchungen von FERRAT 1811 und PELLETIER 1823 beschreiben den bitteren Bestandteil der Blätter als eine "extractartige, gefärbte Materie". 1827 erscheint eine Schrift von

PALLAS über die Analyse von Blättern und Rinde des Ölbaums. Außer Gallussäure, Gerbstoff und einer "krystallinischen, dem Mannit ähnlichen Substanz" fand er einen "bitter-sauern Stoff, der die fieberwidrige Eigenschaften des Ölbaums bedingt". LANDERER isolierte 1836 und 1840 "kleine Nadeln von höchst bitterem Geschmack und an der Luft zerfließlich". 1897 beschreibt CANZONERI "bittere, zuckerartige und harzartige Substanzen, Tannin, Gallussäure und Mannit als Inhaltsstoffe der Ölbaumblätter. 1908 isolierten BOURQUELOT und VINTILESCO aus Blättern und unreifen Oliven einen kristallinen Bitterstoff, den sie Oleuropein nannten; mit Hilfe von Emulsin konnte dessen glykosidische Natur nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigten 1934 CRUESS und ALSBERG, außer Glukose wollten diese als weiteren Bestandteil von Oleuropein Kaffeesäure und einen etherlöslichen bitteren Ester nachgewiesen haben, der vor der Hydrolyse nicht anwesend war. SHASHA und LEIBOWITZ sahen 1959 in Oleuropein einen Diester von Glukose; alle genannten "Oleuropeine" stellen wahrscheinlich Stoffgemische dar. 1958 konnten jedoch PANIZZI und Mitarbeiter Oleuropein rein gewinnen und klärten seine Struktur auf. Die stereochemischen Verhältnisse wurden von INOUYE und Mitarbeitern 1970 beschrieben.

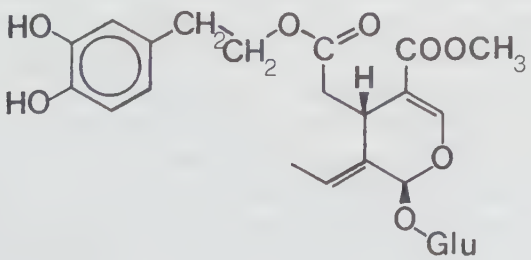


Abb. 1: Oleuropein

Oleuropein gehört zu den phenolisch konjugierten Secoiridoidglykosiden (HEGNAUER 1966, EL-NAGGAR und BEAL 1980). Ebenfalls zu den iridoiden Pflanzenstoffen gehört Elenolid, das 1957 aus Blättern, Früchten und Rinde des Ölbaums gewonnen wurde (VEER und Mitarbeiter). Seine Struktur wurde 1961 von BEYER-

MAN und Mitarbeitern aufgeklärt; Elenolid scheint jedoch kein genuin vorhandener Bestandteil der Pflanze zu sein.
Außer den Bitterstoffen wurden folgende Verbindungen in den Ölbaumblättern nachgewiesen: "Oleanol" von POWER und TUTIN 1908, später als Oleanolsäure identifiziert (VAN DE HAAR 1924), zwei rohe Saponine (DANIEL-BRUNET und OLIVIERO 1939), ein N-haltiges Pseudosaponin (BALANSARD und DELPHAUT 1953), Oleanan (CAPUTO et al. 1974); an flavonoiden Verbindungen wurden Luteolin und seine Glykoside isoliert (BOCKOVA et al. 1963), das Vorkommen von Olivin konnte nicht bestätigt werden (HÄNSEL et al. 1970).
Interessant ist das Vorkommen von Chinaalkaloiden, hauptsächlich Cinchonidin (SCHNEIDER und KLEINERT 1971).
Nach CAVANNA und PIRONA (1950) enthalten die Blätter außerdem noch Harze, etherisches Öl, Carotin, Vitamin A und D sowie eine Oxidiastase. An anorganischen Substanzen wurden Calcium, Kalium, Magnesium, Eisen, Mangan und Phosphor nachgewiesen.

1.4 Wirkung und Anwendung von Blattextrakten

Aufgüsse der Blätter des Ölbaums wurden früher gegen Malaria und Skrofulose angewandt. Tinkturen und Extrakte als Febrifugium, Antiperiodicum und Tonicum (HEGI). Während eines Kriegszugs von Napoleon I. in Spanien (1811/12) benutzten zwei französische Militärärzte, FAURE und BEGUIN, Ölbaumblätter als Chinarinden-Ersatz gegen Malaria. Die Ärzte MERAT und DE LENS empfenlen 1833 Ölbaumblätter-Dekokte als Febrifugium anstelle von Chinin und als Antisepticum gegen Gangrän; diese Anwendung hielt sich bis in die Anfänge unseres Jahrhunderts. Erste Hinweise auf eine antihypertensive Wirkung von Ölbaumblattextrakten gab 1938 MAZET. DANIEL-BRUNET und OLIVIERO schlossen 1939 aus Tierversuchen, daß Ölbaumblattextrakte eine starke Blutdrucksenkung bewirken, die wahrscheinlich auf peripherer Gefäßdilatation beruht, Herztätigkeit und Atmung werden nicht beeinflußt. 1942 wandte JARDON Olea-Infuse in Tierverucnen und in klinischen Untersuchungen an. Nach oraler Gabe konnte eine deutliche

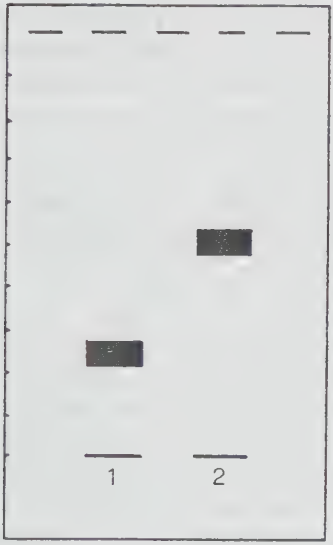
Blutdrucksenkung und eine Blutzuckersenkung beobachtet werden. Klinische Arbeiten von LECLERC 1944, DE NUNNO und CAPRETTI 1951, BALANSARD und DELPHAUT 1953 und SCHWARZ 1954 bestätigten die blutdrucksenkende Wirkung. Einzig über das Wirkungsprinzip war man sich nicht einig. BALANSARD und DELPHAUT hielten das N-haltige Pseudosaponin, das sie Oleosid nannten, für den Wirkstoff, SAMUELSSON 1951 das Cholin. Die blutdrucksenkende Wirkung wurde teils peripher aufgefaßt, teils als Reiz auf das Vasokonstriktorzentrum direkt (ESDORN 1954). JANKU et al. kamen zu dem Schluß, daß die Wirkung einer cholinartigen Substanz zuzuschreiben sei. In Untersuchungen von KOSAK und STERN (1956, 1959, 1960 und 1962) wurde festgestellt:
Bei hypertensiven Ratten und Hunden senkt ein Ölbaumblätter-Infus den erhöhten Blutdruck sofort und langandauernd. Vergleichsweise wurden Untersuchungen mit Apresolin, Nepresol und Reserpin durchgeführt. Das Olea-Infus vereinigte in sich die schnelle Wirkung von Apresolin und Nepresol und die langanhaltende Wirkung von Reserpin. Diese Wirkung konnte mit Cholin nicht erreicht werden. Olea-Infuse wirken nicht zentral, sondern rein peripher. Wäßrige Olea-Extrakte haben einen Einfluß auf den Kupferstoffwechsel des Organismus. Durch Herabsetzung des Kupfergehalts kommt es zu einer Verminderung der Coeruloplasmin-Aktivität und dadurch zu einer Dämpfung der Biosynthese von Noradrenalin. So könnte die Blutdrucksenkung erklärt werden.
PANIZZI et al. erklären 1960 Oleuropein zum therapeutischen Prinzip, ohne jedoch pharmakologische Untersuchungen als Beweis anzuführen. Erst 1972 wird Oleuropein selbst pharmakologisch untersucht (PETKOV und MANOLOV). Bei parenteraler Gabe an Ratten, Hunde und Katzen mit experimentell erzeugter Hypertonie übt Oleuropein eine reproduzierbare hypotensive Wirkung aus. Normotoner Blutdruck wird nicht beeinflußt. Gleichzeitig zeigt Oleuropein eine dilatierende Wirkung auf die Koronargefäße sowie eine ausgeprägte antiarrhythmische Wirkung. Die hypotensive Wirkung wird komplexen, sowohl zentralen als auch peripheren Mechanismen zugeschrieben. Die orale Anwendung von Oleuropein wurde nicht untersucht.

Ölbaumblätterextrakt wird heute allein (Olivysat^{R}) oder in Kombinationspräparaten (Arte Rutin^{R}, Gomban^{R}, Neo-Nervisal^{R}, Reginol^{R}, Rauwoplant^{R} u. a.) als Cardiotonicum angewandt.

1.5 Zu Beginn der Arbeit vorliegende Untersuchungen

Bei Inkubationsversuchen von Oleae folium mit primären aliphatischen Aminen wurde dünnschichtchromatographisch die Entstehung Dragendorff-positiver Substanzen beobachtet (SCHNEIDER 1975, pers. Mitteilung).
Die Substanzen werden erhalten, wenn die grob gepulverte Blattdroge in wäßrigem, schwach saurem Milieu direkt mit primären Aminen inkubiert wird. Diese Substanzen lassen sich mit Chloroform, nicht aber mit Diethylether aus dem neutralisierten Filtrat des Reaktionsansatzes ausschütteln.
Als stickstoffhaltige Reaktionspartner wurden Ammoniak, Anilin, Methylamin, Phenylethylamin und Nor-Pseudoephedrin eingesetzt. Die Reaktionen verliefen mit Ammoniak und Anilin negativ, mit den anderen Reagenzien entstanden Dragendorff-positive Verbindungen. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden die Untersuchungen zunächst mit dem einfachsten Amin, Methylamin, sowie mit Phenylethylamin durchgeführt. Abbildung 2 zeigt die interessierenden Reaktionsprodukte, im folgenden mit der Arbeitsbezeichnung "Oleamine" versehen. Charakterisierung der Banden: Im Tageslicht gelb, im kurzwelligen UV-Licht fluoreszenzmindernd, im langwelligen UV-Licht intensiv gelbe Fluoreszenz. Die Rf-Werte betragen für Methyl-Oleamin 0.25 und für Phenylethyl-Oleamin 0.5. Es konnte eine deutliche Abhängigkeit von den Parametern pH-Wert des Reaktionsmediums, Inkubationsdauer und Temperatur festgestellt werden. Die besten Ergebnisse wurden in Standard-Acetat-Puffer nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden im Temperaturbereich von 30 bis 37°C erzielt. Weitere Versuche befaßten sich mit Einflüssen von Reduktions- und Oxidationsmitteln auf die Oleamin-Bildung. Bei Reduktion des gesamten Reaktionsansatzes entsteht ein anderes Reaktionsprodukt; Reduktion des ursprünglichen Reaktionsproduktes führt aber anscheinend zu Zerstörung desselben,

Abb. 2: DC-Schema von Methyl- und Phenylethyl-Oleamin
Fließmittel Benzol/Rotisol 8:2, NH_3-Atmosphäre
Detektion mit Dragendorff-Reagenz



1 Methyl-Oleamin
2 Phenylethyl-Oleamin

es scheint auch nicht in das neue Reaktionsprodukt überzugehen. Unter Oxidationsschutz mit Ascorbinsäure entsteht kein Oleamin, und so wurde auch der Einfluß von Oxidationsmitteln auf die Oleamin-Bildung untersucht. Die Zugabe von Eisen-III-Salzen wie Kaliumhexacyanoferrat(III) während der Reaktion führt zu einer signifikanten Erhöhung der Menge an Reaktionsprodukt. In Gegenwart von Wasserstoffperoxid findet dagegen die Bildung von Oleaminen nicht statt. Ein weiterer wichtiger Befund war, daß durch Aufkochen des Reaktionsansatzes vor der Inkubation eine Oleamin-Bildung ausbleibt.
Bis zu diesem Zeitpunkt war immer die Gesamtdroge an der Reaktion beteiligt. Versuche, nur den wäßrigen Drogenauszug mit Aminen reagierenzu lassen, führten nicht zur Oleamin-Bildung. Wurde jedoch die extrahierte Droge wieder dem Reaktionsansatz hinzugefügt, entstanden auch wieder Oleamine.
Daß der Reaktand zur Oleamin-Bildung sich im Extrakt befindet und nicht auf der Droge, zeigte sich, als steigende Extraktmengen mit gleichbleibenden Mengen an extrahiertem Drogen-

material inkubiert wurden. Mit der Extraktmenge stieg auch die Oleamin-Ausbeute. Letztere Erkenntnisse und die Empfindlichkeit gegen Aufkochen förderten die Vermutung, daß ein enzymatischer Faktor bei der Reaktion beteiligt ist, der auf dem mit Wasser extrahierten Drogenmaterial verbleibt. Hingegen gelang es, durch erschöpfende wäßrige Extraktion praktisch Reaktand-freies Drogenmaterial zu erhalten.

Da Oleuropein als möglicher Reaktand für die Alkaloid-Bildung infrage kam, mußte eine Methode gefunden werden, reines Oleuropein zu erhalten. Erste Versuche befaßten sich mit der Reinigung von nach der DAC-Methode gewonnenem Oleuropein, das in relativ großer Ausbeute anfiel (über 4 %). Da aber dc nachgewiesen werden konnte, daß das DAC-Oleuropein zu einem großen Anteil Ballaststoffe enthielt, wurde von der DAC-Methode abgegangen und eine andere Isolierungsmethode entwickelt. Das größte Problem bildet die Abtrennung phenolischer Ballaststoffe. Zunächst wurde versucht, lipophile Begleitstoffe vor der Säulenchromatographie aus dem Extrakt zu entfernen. Die Anwendung von Petrolether, Ether, Ether/Ethylacetat sowie Benzol als Vorextraktionsmittel führte aber größtenteils zu hohen Oleuropein-Verlusten. Die Fällung der phenolischen Begleitstoffe mit 10-prozentiger Bleiacetat-Lösung erwies sich in seiner Effektivität auf den Reinigungsprozeß als zu gering. Da Oleuropein wegen seines 3.4-Dihydroxyphenylethanol-Anteils ebenfalls zu den phenolischen Pflanzenstoffen gehört, ist eine Reinigung über Aluminiumoxid nicht angebracht. Jedoch bietet sich die Entfernung der Flavonoide durch Komplexbildung mit Aluminiumchlorid an. Diese Methode erwies sich dc als sehr effektiv und wurde säulenchromatographisch angewandt. Das beste Ergebnis brachte folgendes Vorgehen: Die grob gepulverte Droge wird erschöpfend mit Aceton ausgezogen. Das Filtrat wird im Vakuum getrocknet und mit Wasser aufgenommen, wobei große Mengen eines nicht bitteren Niederschlags anfallen. Von diesem wird abzentrifugiert und der Überstand im Vakuum getrocknet. Der Rückstand wird über eine mit 0.5 % Fließmittel desaktivierte Kieselgelsäule mit Chloroform/Methanol 7:3 chromatographiert. Die Oleuropein-haltige Fraktion wird zur Trockne eingeengt.

Das so erhaltene Oleuropein ist praktisch DC-rein.
Mit dem so erhaltenen reinen Oleuropein wurde versucht, Umsetzungsprodukte mit primären Aminen zu erhalten. Die Ergebnisse der Reaktionsansätze erbrachten aber keine Dragendorff-positiven Substanzen. Inkubationsversuche mit Olea folium konnten zusätzlich sicherstellen, daß die Reaktionsprodukte während der Inkubation nicht aus Oleuropein entstehen, da sie gleichermaßen und in gleicher Menge bei der Inkubation von Oleuropein-haltigen und Oleuropein-freien Extrakten mit Aminen entstehen. Orientierende Versuche mit acetyliertem und methyliertem Oleuropein sowie auch mit hydrolysiertem Oleuropein brachten keine eindeutigen, weiterführenden Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde zunächst die Suche nach Reaktanden aus der Iridoid-Gruppe aufgegeben und ein anderer Weg beschritten. In weiteren Untersuchungen zur Reinigung des Extraktes wurde nun auf neutrales Aluminiumoxid mit gutem Erfolg zurückgegriffen. Der Reaktand wird nicht adsorbiert, während es gelingt, phenolische Begleitstoffe und Pigmente aus dem Extrakt zu entfernen.

1.6 Problemstellung

An dieser Stelle setzen die Untersuchungen zu der hier vorliegenden Arbeit ein, welche die Klärung des folgenden Fragenkomplexes bringen soll:

- Welche Struktur besitzt das Oleamin ?
- Welcher Inhaltsstoff ist für die Oleamin-Bildung verantwortlich ?
- Welche Rolle kommt dem extrahierten Drogenmaterial bei der Oleamin-Bildung zu ?

Darüberhinaus war nach Klärung dieser Fragen von Interesse, quantitative Bestimmungsmethoden für den Reaktanden und die Oleamine zu entwickeln.

2. REAKTIONSPRODUKTE GEREINIGTER OLEA-EXTRAKTE MIT PRIMÄREN AMINEN

2.1 Standardisierung der Verfahren zur Extraktbereitung und Verarbeitung der Droge

Die trockenen und grob pulverisierten Ölbaumblätter wurden mit der doppelten Menge Ethanol 50 % durchfeuchtet und nach Stehenlassen über Nacht in einem Perkolator mit destilliertem Wasser extrahiert. Dabei wurde die der fünffachen Drogeneinwaage entsprechende Menge an Extrakt aufgefangen und im Vakuum auf die Relation 1:1 konzentriert; die dabei anfallenden Niederschläge wurden verworfen, da sie nicht Reaktand-haltig waren. Der klare braune Extrakt wurde über die 1.5fache Menge neutrales, durch 15 % Wasserzugabe desaktiviertes Aluminiumoxid (nach Brockmann) filtriert und das der fünffachen Drogenmenge entsprechende Volumen an Eluat aufgefangen. Das chromgelb gefärbte Eluat wurde im Vakuum so konzentriert, daß 1 ml Extrakt 1 g Droge entsprach. Das Endprodukt ist ein klarer brauner Extrakt von aromatischem Geruch und stark bitterem Geschmack, er ist Oleuropein-frei. Der Extrakt wurde kühl aufbewahrt und war etwa drei Monate lang stabil, wie regelmäßige Kontrolluntersuchungen zeigten.

Das extrahierte Blattmaterial wurde nun noch so lange mit destilliertem, chloroformgesättigtem (um Pilz- und Bakterienbefall zu verhindern) Wasser perkoliert, bis das Eluat völlig farb- und geschmacklos war (72 Stunden). Das Material wurde 24 Stunden lang bei 40°C im Umlufttrockenschrank getrocknet; es war zur Oleamin-Bildung genauso befähigt, wie frisch extrahiertes, feuchtes Drogenmaterial. Kontrollreaktionen in regelmäßigen Abständen zeigten, daß es diese Fähigkeit bei Aufbewahrung bei Raumtemperatur in einem dicht geschlossenen Gefäß aus braunem Glas auch noch nach einem Jahr nicht verloren hatte.

2.2 Standardisierung der Reaktionsbedingungen

Zur schnellen Durchführung der Reaktion mit kleinen Mengen

eignete sich folgende Versuchsausführung, die gleichzeitig halbquantitative Aussagen über die gebildete Alkaloidmenge zuließ:

1 ml Standardextrakt wird mit jeweils 50 µl Methylamin (in 35-40-prozentiger Lösung), Eisessig und Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung 20 % sowie 0.25 g (etwa eine Spatelspitze, minimale Gewichtsabweichungen beeinflußten das Ergebnis nicht) extrahiertem Drogenmaterial ad 10 ml Wasser bei 37°C (Wasserbad mit Schüttelvorrichtung) für zwei Stunden inkubiert. Der Reaktionsansatz hat einen pH-Wert von etwa 4.6. Danach wird sofort fünf Minuten lang scharf abzentrifugiert, der Überstand mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und dreimal mit je 10 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphase wird über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird in 100 µl Rotisol aufgenommen, 50 µl gelangen zur DC. Diese erfolgt auf Kieselgel-DC-Platten mit Fluoreszenzindikator. Fließmittel ist Toluol/Rotisol 75:25, Laufhöhe 8 cm. Methyl-Oleamin erscheint bei Rf 0.31. Die Detektion erfolgt, wie bereits erwähnt, im langwelligen UV-Licht (gelbe Fluoreszenz) und mit Dragendorff-Reagenz (mod. nach Munier und Macheboeuf), das eine orangerote Bande auf gelblichem Untergrund ergibt. Bei späteren Untersuchungen zeigte sich, daß ein Neutralisieren des Ansatzes vor dem Ausschütteln nicht notwendig ist, Methyl-Oleamin läßt sich auch aus essigsaurem Milieu ausschütteln.

Um zu klären, ob die eingesetzte Menge an Methylamin optimal war, wurde die bei dem Standard-Reaktionsansatz verwendete Menge von 50 µl = 1 gesetzt und die Reaktion parallel dazu mit einer Menge von 2, 1/10 und 1/100 Methylamin durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß eine Erhöhung der Methylamin-Menge nicht zu einer Mehrbildung von Reaktionsprodukt führt. Hingegen entsteht bei einer Verringerung der Menge auf 1/10 nur noch sehr wenig Reaktionsprodukt, während mit 1/100 kein Methyl-Oleamin mehr detektierbar ist.

2.3 Isolierung von Methyl-Oleamin

Die Darstellung erfolgt analog dem unter 2.2 beschriebenen Verfahren, lediglich mit größeren Ansätzen. Die Methyl-Oleamin haltigen Dichlormethanphasen werden im Vakuum auf wenige ml konzentriert. Anschließend wird über eine Kieselgelsäule mit dem gleichen Fließmittel wie bei der DC chromatographiert. Das Reaktionsprodukt ist an seiner zitronengelben Farbe gut zu erkennen. Die gelben Fraktionen werden nach DC-Kontrolle vereinigt und zur Trockne gebracht und dc über Kieselgel weiter gereinigt. Die gefärbten Fraktionen ergeben auf der Platte zwei Zonen: Eine starke Hauptzone und dicht darüber eine sehr schwache Nebenzone (Trennung nach mehrfachem Durchlauf des Fließmittels). Nach der Elution der Hauptzone mit Ethanol 96 % aus dem Kieselgel wird diese nochmals durch Ausschüttelung der in wäßriges ammoniakalisches Milieu überführten Verbindung mit Chloroform gereinigt. Der Rückstand wird nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum in wenig erwärmtem Ethanol abs. gelöst. Beim Abkühlen und anschließenden Stehenlassen über Nacht kristallisiert Methyl-Oleamin als zitronengelbe Nädelchen aus. Diese werden über Phosphorpentoxid getrocknet.

2.4 Eigenschaften und Identifizierung von Methyl-Oleamin

Der Schmelzpunkt von Methyl-Oleamin liegt bei 180°C. Beim Abkühlen auf dem Schmelzblock rekristallisieren die Nädelchen. Methyl-Oleamin ist löslich in Wasser, Alkohol, Chloroform und Dichlormethan. Wenig löslich ist es in Aceton und Ethylacetat, in Diethylether und Toluol ist es praktisch nicht löslich. Gegen starke Säuren und Basen ist die Substanz sehr empfindlich, im pH-Bereich zwischen 4 und 8 ist die Stabilität, zumindest kurzfristig , nicht beeinträchtigt. Methyl-Oleamin läßt sich weder mit Bleiacetat- noch mit Pikrinsäure-Lösungen fällen. Zunächst wurde Methyl-Oleamin dc charakterisiert. Die Ergebnisse sind im folgenden tabellarisch zusammengefaßt:

Tab. 1: DC-Charakterisierung von Methyl-Oleamin auf Kieselgel F 254, Fließmittel Toluol/Rotisol 75:25

a) Einfluß des pH-Werts der Kammeratmosphäre auf das Fließverhalten von Methyl-Oleamin

Kammer-atmosphäre	neutral	Essigsäure	Salzsäure	Ammoniak
Rf-Wert	0.31	0.34	-	0.63

b) Eigenschaften von Methyl-Oleamin im UV-Licht

254 nm	365 nm
Fluoreszenzminderung	gelbe Fluoreszenz

Die Eigenschaften sind mit dem im Olea-Inkubations-Ansatz durch DC detektierten und Methyl-Oleamin genannten Produkt identisch.

c) Verhalten gegenüber Sprühreagenzien

Reagenz	Hinweis auf	Ergebnis
$AgNO_3/NH_4OH$	Reduzierende Gruppen	negativ
Anilinphthalat	Reduzierende Zucker	negativ
Diazotierte Sulfanilsäure	zu Azokupplung befähigte Gruppen	positiv
Dipikrylamin	Cholin und Derivate	negativ
2.4-DNPH-Reagenz	Carbonylgruppen	nicht eindeutig
Dragendorff	Alkaloide	positiv
Ehrlichs Reagenz	Amine	negativ
$FeCl_3$	Phenolische OH-Gruppen	negativ
HNO_3	Alkaloide und Amine	positiv
Joddämpfe	Doppelbindungen	positiv
$KMnO_4$	Oxidierbare Verbind.	negativ
Ninhydrin	Aminosäuren	negativ

Tab. 2: Physikochemische Daten von Methyl-Oleamin

Molekülmasse, M^+	235		
Elementaranalyse		Berechnet:	Gefunden:
	C:	61.27	60.80
	H:	5.53	5.76
	N:	5.96	6.11
	O:	27.23	27.31
Summenformel	$C_{12}H_{13}NO_4$		
Schmelzpunkt	180°C (Kofler Mikroheiztisch)		
UV/VIS-Spektrum	λ max = 356 nm		
^{1}H-NMR-Spektrum Chemische Verschiebung δ/ppm	c	C-CH_3	1.61 d
	b	N-CH_3	3.54 s
	a	O-CH_3	3.83 s
	g	C-1-H	5.00 q
	f	C-6-H	6.06 d
	e	C-8-H	6.48 q
	d	C-3-H	7.71 d
IR-Spektrum Banden Wellenzahl/cm^{-1}		=C-H	3080, 3030
		CH_3	2960 - 2840 (N, C, O)
		C=O	1690, 1670
		N-C=O	1635
		O-C=O	1230, 1100
		C-O-C	1155

Die Lage des Absorptionsmaximums im UV/VIS-Spektrum (Abbildung 3) weist auf konjugierte Doppelbindungen hin. Das Massenspektrum (Abbildung 5) zeigt den Molekülpeak M^+ m/e = 235. In Verbindung mit der Elementaranalyse wurde die Summenformel $C_{12}H_{13}NO_4$ ermittelt. Das genaue Molekulargewicht beträgt

235.24. Es ergeben sich 7 Doppelbindungsequivalente. Aufgrund der vielen Doppelbindungen im Verhältnis zur Summenformel wurde ein Zwei-Ring-System angenommen. In Verbindung von Massen-, IR- und ^{1}H-NMR-Spektrum können weiterführende Anhaltspunkte gewonnen werden.

Abb. 3: Absorptionsspektrum von Methyl-Oleamin
0.75 mg/100 ml Ethanol abs.

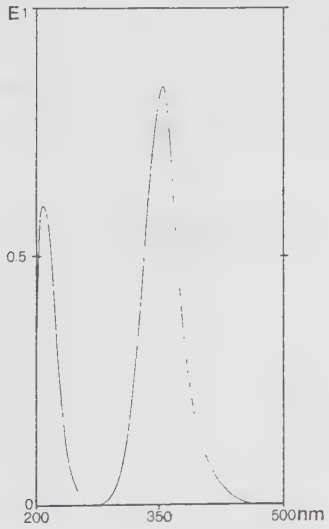
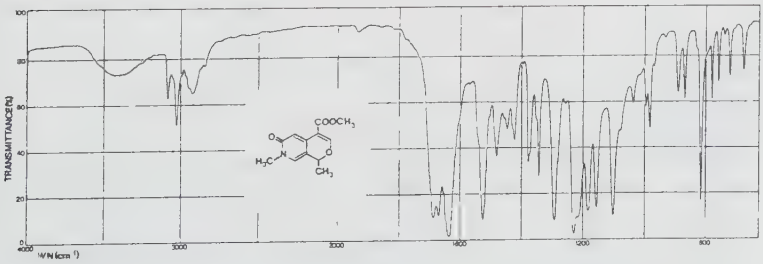


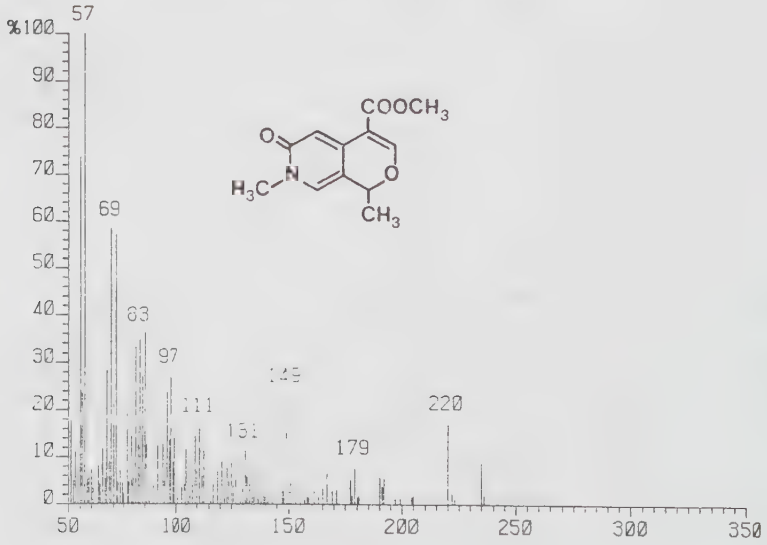
Abb. 4: IR-Spektrum von Methyl-Oleamin



Die Banden bei 3080 und 3030 cm^{-1} im IR-Spektrum können =C-H-Streckschwingungen zugeordnet werden, die Banden im Bereich von 2960 bis 2840 cm^{-1} deuten auf das Vorliegen von Methyl-

gruppen. Starke Banden im C-O-Valenzbereich geben Hinweis auf eine Esterstruktur (1100 und 1230 cm^{-1}), der durch starke Banden im Bereich von 1670 bis 1690 cm^{-1} unterstützt wird. Wahrscheinlich ist eine weitere Carbonylfunktion, möglicherweise innerhalb eines Lactams, worauf eine weitere starke Bande bei 1635 cm^{-1} deutet.
Zur besseren Handhabung des ^{1}H-NMR-Spektrums wurden die auftretenden Signale des zu untersuchenden Moleküls willkürlich von a bis g bezeichnet. Das ^{1}H-NMR-Spektrum beweist die Existenz von drei Methylgruppen a, b, c.
Auch das Massenspektrum deutet auf Abspaltung von Methylgruppen durch das Auftreten eines Bruchstücks von m/e = 220 (= 235 minus 15).

Abb. 5: Massenspektrum von Methyl-Oleamin



Beim ^{1}H-NMR-Spektrum ergibt die Integration der Flächen, daß das Duplett c bei 1.61 ppm drei Methylprotonen zuzuordnen ist, die Singuletts bei 3.54 (b) und 3.83 (a) ppm ebenfalls jeweils drei einander equivalenten Protonen. Vier weitere Protonen ergeben Signale bei 5 ppm (e) (= doppeltes Quartett), 6.06 ppm

(g) (Duplett), 6.48 ppm (f) (Quartett) und 7.71 ppm (d) (Duplett). Das bei tiefstem Feld auftretende Signal legt das Vorliegen eines Aromaten nahe. Dies konnte jedoch durch das IR-Spektrum nicht bestätigt werden. Sehr charakteristisch sind jedoch Signale bei 7.4 bis 7.8 ppm für das C-3-Proton der Enolether-Doppelbindung von Iridoiden, wenn C-4 durch einen Ester substituiert ist.(RIMPLER 1978, EL-NAGGAR und BEAL 1980).

Abb. 6: Iridoid-Grundgerüst

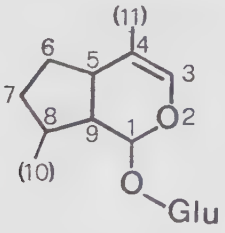
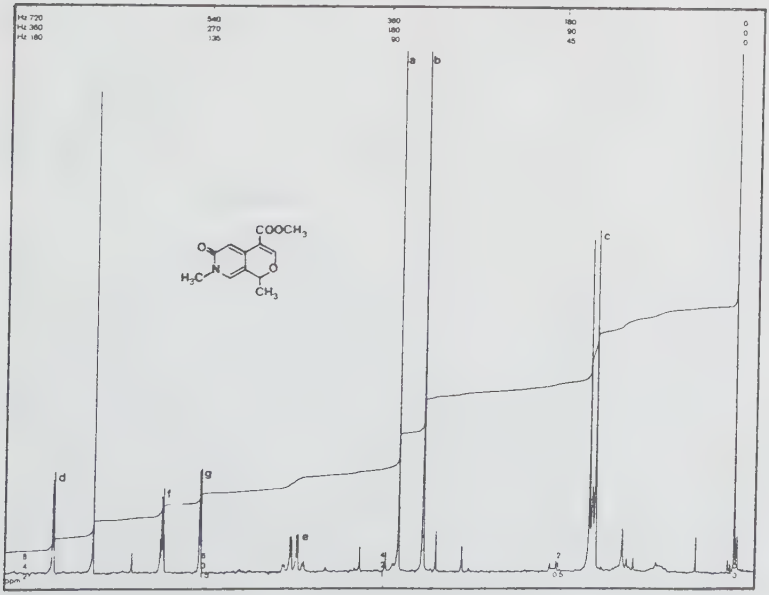
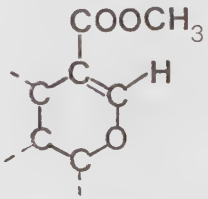


Abb. 7: ^{1}H-NMR-Spektrum von Methyl-Oleamin



Dupletts an dieser Stelle treten auf, wenn entweder C-4 oder C-5 substituiert sind. Da das Signal bei höherem Feld auftauchen würde, wenn C-4 nicht substituiert wäre (6.4 bis 6.6 ppm), kann ein Substituent an C-5 ausgeschlossen werden. Für das Vorliegen eines Methylesters sprechen die Singuletts a und b bei 3.54 und 3.83 ppm, da Methylgruppen an C-Atomen üblicherweise bei höherem Feld erscheinen, wie in diesem Fall Signal c bei 1.61 ppm. Wenn also wirklich ein Iridoid-Anteil im Molekül als gegeben angenommen wird, kann die folgende Struktur als gesichert gelten:

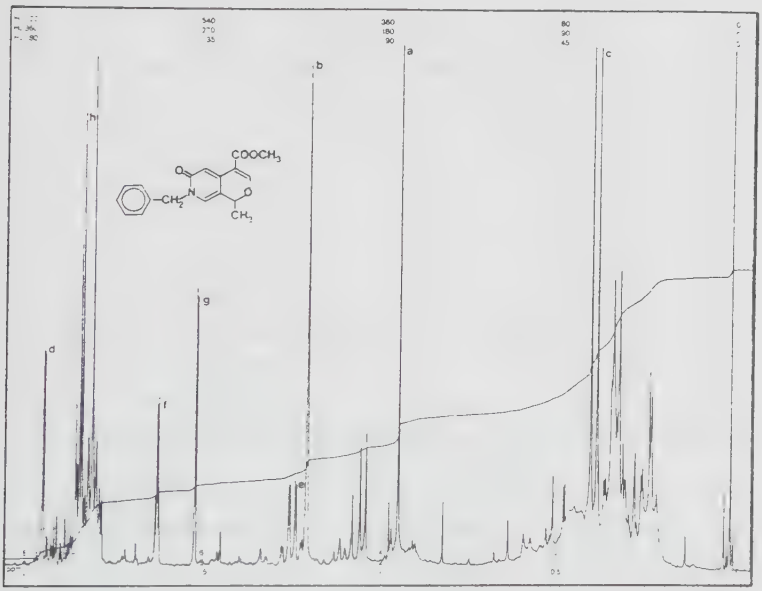
Abb. 8: Teilstruktur von Methyl-Oleamin



Ein intaktes Iridoid-Glykosid kann ausgeschlossen werden, da nur noch maximal drei C-Atome ohne Methyl-Substituenten vorhanden sein können. Außerdem war die Reaktion mit Anilinphthalat nach Säurebehandlung des DC zum Zweck der hydrolytischen Spaltung glykosidischer Verbindungen negativ. Durch Deuteriumoxid-Austausch wurde die Existenz von OH- und NH-Gruppen ausgeschlossen. Auch das IR-Spektrum gibt keinen Hinweis auf eine OH-Gruppe. Iridoidglykoside sind aber nach Verlust des Zuckeranteils sehr instabil und neigen zu Ringöffnung; in diesem Fall ist der Ring intakt, C-1 muß daher durch einen anderen Substituenten stabilisiert sein. Infrage kommen entweder eine Carbonylfunktion, auf die auch das IR-Spektrum hinweist, oder ein anderer Substituent. Möglicherweise ist dies die C-Methylgruppe c bei 1.61 ppm, die mit einem weiteren Proton koppeln muß, da sie als Duplett erscheint. Die Kopplungskonstante beträgt J_c = 6.3 Hz und stimmt überein mit einer Kopplungskonstanten des doppelten Quartetts e (J_e = 6.3 und 1.8 Hz). Über eine dritte Methylgruppe (a oder b) besteht noch Unklarheit, sie kann sich an einem C, O oder N befinden. Eine weitere O-CH_3-Gruppe ist unwahrscheinlich, da von den vier im

Molekül enthaltenen O-Atomen bereits drei als relativ gesichert gelten können. Das vierte O-Atom kann laut IR-Spektrum einer zweiten Carbonylbande zugeordnet werden, also kommt für die dritte Methylgruppe nur noch C oder N infrage. Hierüber gibt das ^{1}H-NMR-Spektrum des Benzyl-Derivates, das zur Klärung dieser Frage dargestellt wurde, Klarheit:

Abb 9: ^{1}H-NMR-Spektrum von Benzyl-Oleamin



Bei der Reaktion mit Benzylamin anstelle von Methylamin muß ein Methyl-Signal verschwinden und dafür ein Methylen-Signal auftauchen. Dies ist der Fall: Bei Aufnahme des Spektrums von Benzyl-Oleamin verschwindet das Singulett b bei 3.54 ppm. Dafür tritt bei 4.84 ppm ein neues Singulett auf. Die Integration ergibt zwei Protonen, analog der Methylgruppe des Methyl-Derivates. Durch die Entschirmung durch den Aromaten ist das Signal zu tieferem Feld verschoben. Den Aromaten selber signalisiert ein schlecht aufgelöstes Multiplett bei ca. 7.3 ppm. Damit ist die Existenz einer N-CH_3-Gruppe bei 3.53 ppm (b) im Methyl-Derivat sichergestellt.

Diese Gruppe kann man laut IR-Spektrum möglicherweise mit der Carbonylfunktion als Lactam-Anteil des Moleküls in Verbindung bringen. Die Betrachtung des Massenspektrums erhärtet diese Annahme durch das Auftreten eines sehr intensiven Peaks bei m/e 57 (= $C_2H_3NO^{+\cdot}$).

Tab. 3: Vergleich der ^{1}H-NMR-Spektren von Methyl- und Benzyl-Oleamin (Lösungsmittel $CDCl_3$, Standard TMS)

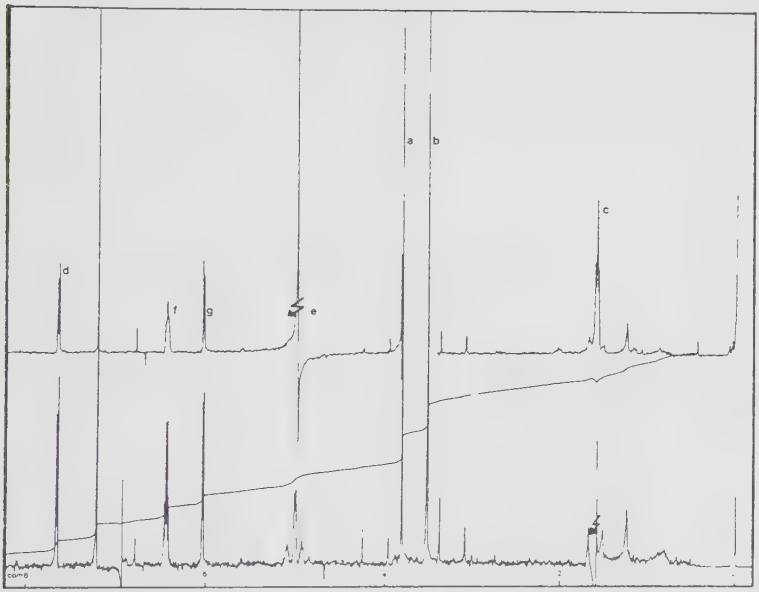
Signale	Chemische Verschiebung δ/ppm	
	Methyl-Oleamin	Benzyl-Oleamin
c C-CH_3	1.61 d	1.55 d
b N-CH_3	3.54 s	-
b N-CH_2	-	4.84 s
a O-CH_3	3.83 s	3.82 s
g C-1-H	5.00 q	4.97 q
f C-6-H	6.06 d	6.09 d
e C-8-H	6.48 q	6.50 q
d C-3-H	7.71 d	7.82 d
h Aromat	-	7.37 m

Weitere Hinweise, welche die schließlich vorgeschlagene Struktur wahrscheinlich machen, geben Entkopplungsversuche: Wenn c entkoppelt wird, ändert sich das e-Signal, die Kopplungskonstante beträgt $J_{c/e}$ = 6.3 Hz. Wird e entkoppelt, ändern sich c (Duplett zu Singulett) und f (Quartett zu Singulett). Die Kopplungskonstanten betragen $J_{e/c}$ = 6.3 Hz und $J_{e/f}$ = 1.8 Hz. Die Aufspaltung von e in ein doppeltes Quartett läßt auf kompliziertere Kopplungen schließen, die schwer interpretierbar sind.

Bei Entkopplung von g ändern sich die Signale von e und f, die Kopplungskonstanten betragen jeweils $J_{g/e}$ und $J_{g/f}$ = 1.8 Hz. Wird d entkoppelt, ändert sich nur f ($J_{d/f}$ = 1.8 Hz), bei Entkopplung von f ändern sich die Signale d (Duplett zu Singulett), e (doppeltes Quartett zu Quartett) und g (Duplett zu Singulett). Die Kopplungskonstanten $J_{f/d}$, $J_{f/e}$ und $J_{f/g}$ betra-

Abb. 10: ^{1}H-NMR-Spektren (entkoppelt) von Methyl-Oleamin

a) c/e



b) g/e

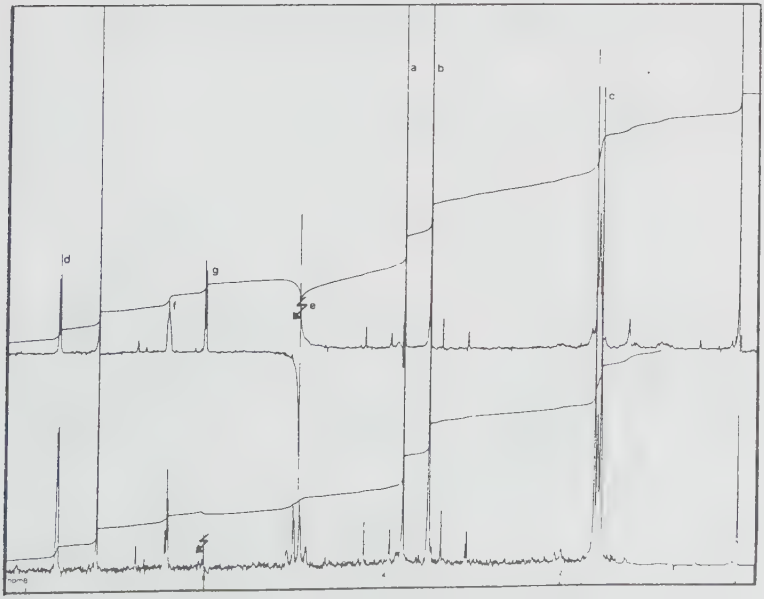
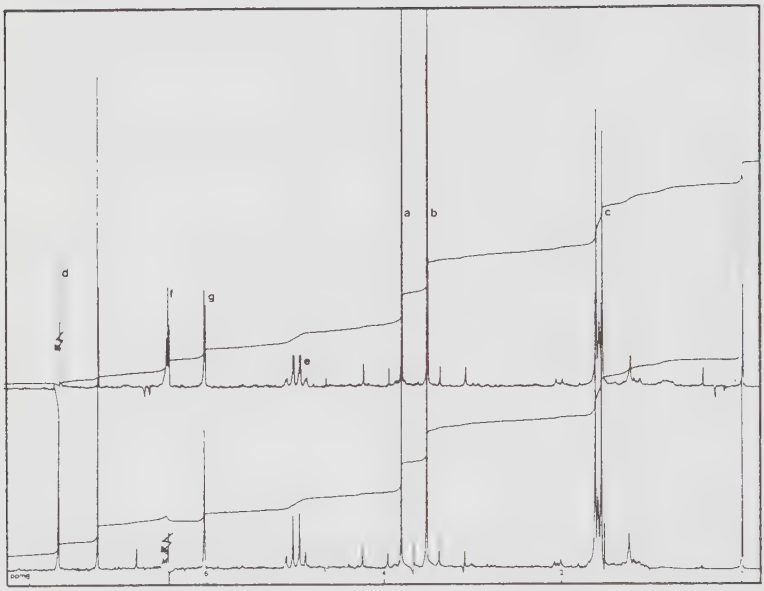
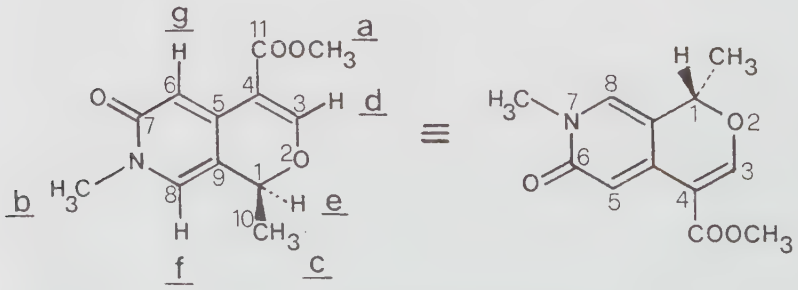


Abb. 10: ^{1}H-NMR-Spektren (entkoppelt) von Methyl-Oleamin
c) d/f



gen jeweils 1.8 Hz. Diese Kopplungen lassen sich an der schließlich vorgeschlagenen Struktur gut verifizieren.

Abb. 11: Strukturformel von Methyl-Oleamin
bzw. Methyl-Elenolactam



Demnach stellt Methyl-Oleamin das Lactam eines C-10-Körpers dar. Da das C-Grundgerüst und die Substituenten des Pyranrings der Elenolsäure sehr nahe stehen, wird vorgeschlagen, die Arbeitsbezeichnung Methyl-Oleamin nicht beizubehalten, und für das Alkaloid die Bezeichnung Methyl-Elenolactam zu wählen. Die systematische Bezeichnung lautet (1S)-6.7-Dihydro-1.7-dimethyl-6-oxo-1H-pyrano[3.4-c]pyridin-4-carbonsäuremethylester.

2.5 Reaktionsmechanismus zur Bildung von Methyl-Elenolactam

Die Reaktion verläuft in saurer Lösung zunächst als nucleophile Addition des Amins an die Aldehydgruppe von Elenolsäure I oder einen dieser Verbindung equivalenten C-10-Körper. Unter Abspaltung von Wasser entsteht ein Imin II (Azomethin). Daraufhin erfolgt ein zweiter nucleophiler Angriff des freien Stickstoff-Elektronenpaars an der in saurer Lösung protonierten Carbonylgruppe des Acyls; diese Reaktion läuft im Sinne eines S_N2_t-Mechanismus ab. Da sich die beiden reaktiven Gruppen im gleichen Molekül in Delta-Stellung befinden, findet eine Zyklisierung zum Lactam III statt. Solche fast völlig spannungsfreien Ringe bilden sich schon bei relativ milden Bedingungen in Gegenwart geringer Mengen an Säure. Die Doppelbindung der Verbindung IV zwischen C-5 und C-6 entsteht durch Dehydrogenierung.

Abb. 12: Vorschlag für einen Reaktionsmechanismus zur Bildung von Elenolactamen am Beispiel von Methyl-Elenolactam

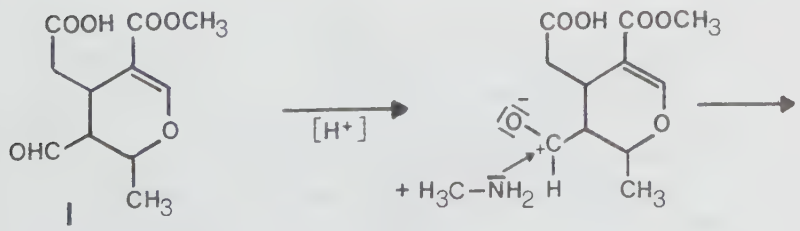
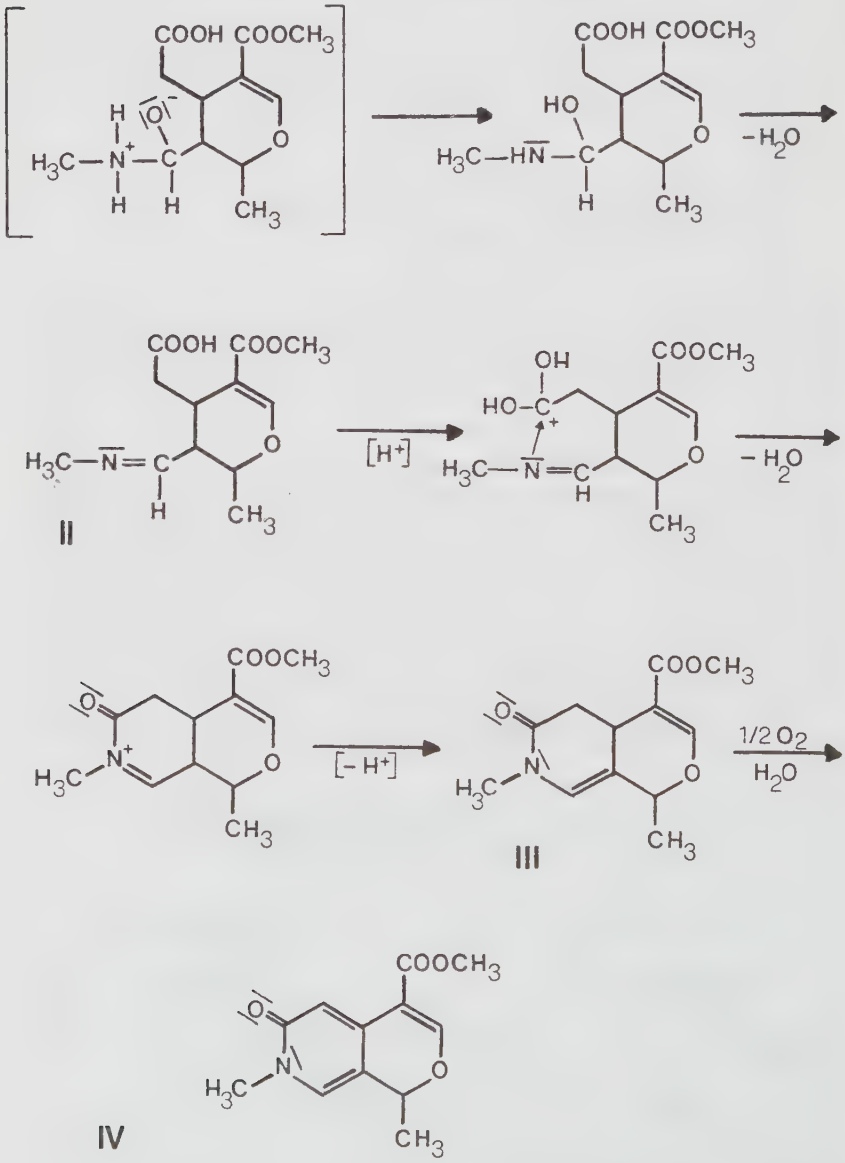


Abb. 12: (Fortsetzung) Vorschlag für einen Reaktionsmechanismus zur Bildung von Elenolactamen am Beispiel von Methyl-Elenolactam



2.6 Versuche zur quantitativen Bestimmung von Methyl-Elenolactam

Die unter 2.2 beschriebene Methode (Standardisierung der Reaktionsbedingungen) gestattet überschlagsmäßige Mengenangaben des entstehenden Reaktionsprodukts und damit rückwirkend auch des Reaktanden selbst. Zur quantitativen Bestimmung geringer Mengen von Methyl-Elenolactam bietet sich die spektroskopische Direktmessung der Substanz bei 356 nm an. Da von Methyl-Elenolactam nur eine geringe Menge als Vergleichssubstanz zur Verfügung stand, wurde zur Aufstellung der Meßwerte eine Referenzsubstanz gesucht, die sich photometrisch möglichst ähnlich verhielt.
Als gut geeignet erschien Pikrinsäure, die nicht nur das gleiche Absorptionsmaximum im UV-Licht hat, sondern sich auch in ihrem DC-Fließverhalten dem Methyl-Elenolactam ähnlich verhält. Die Molekulargewichte der beiden Substanzen liegen ebenfalls sehr nahe beieinander.

Tab. 4: Vergleich der Eigenschaften von Methyl-Elenolactam und Pikrinsäure

	Methyl-Elenolactam	Pikrinsäure
Molekulargewicht	235.24	229.11
λ max/nm	356	356
log ε	4.4183	4.2148

Für Methyl-Elenolactam-Reinsubstanz wurden Eichgeraden in absolutem Ethanol und nach Rückgewinnung von DC-Platten aufgestellt. Es zeigte sich, daß die Wiedergewinnung nach dc-Durchlauf nur etwa 60 % beträgt. Zur Ermittlung möglicher Fehlerquellen wurden verschiedene Bedingungen untersucht.
Die Platten wurden mit dem gleichen Fließmittel vorentwickelt, um etwaige störende Verunreinigungen zu entfernen; verschiedene Lösungsmittel zur Messung wurden geprüft, sowie Zusätze

Abb. 13: Eichgeraden für Methyl-Elenolactam-Reinsubstanz-Lösung 4.255 mM vor (L) und nach (P) DC

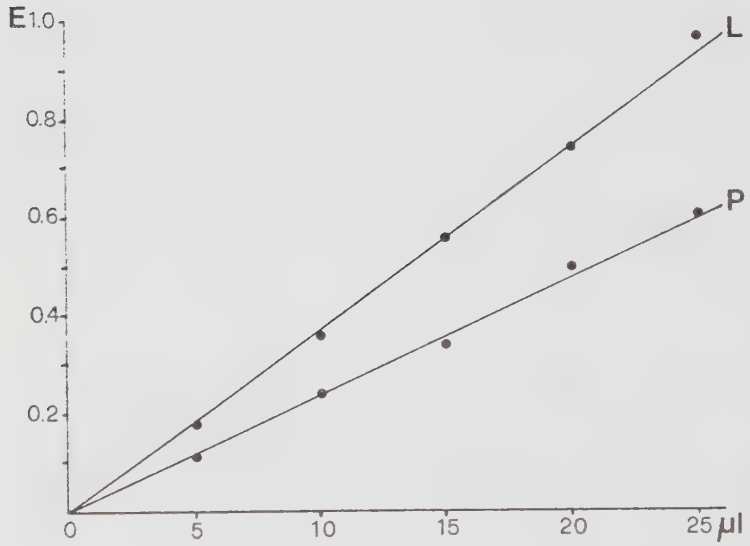
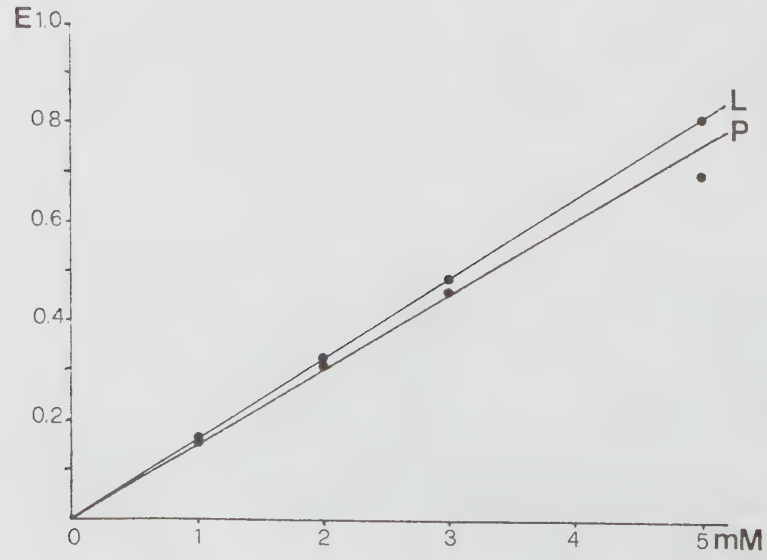


Abb. 14: Eichgeraden für Pikrinsäure-Lösung 0.1 mM vor (L) und nach (P) DC

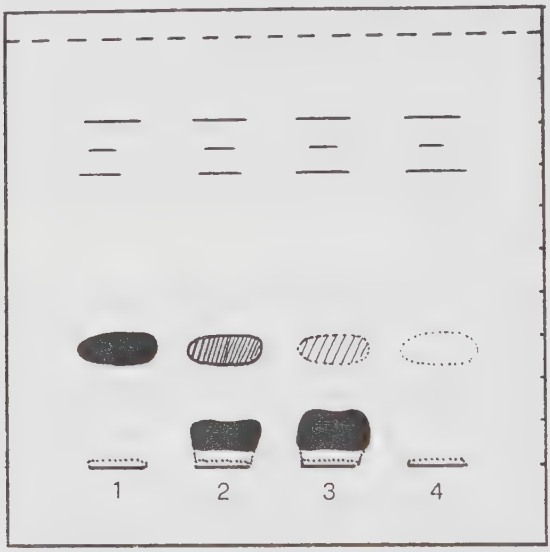


von EDTA zur Entfernung von eventuell störenden Metallionen und Ammoniak zur Stabilisierung des Elenolactams. Eine Verbesserung der Wiederfindungsrate wurde nicht erreicht. Unter den gleichen Bedingungen wurden Eichkurven für Pikrinsäure aufgestellt, hier beträgt die Wiederfindungsrate nach DC ca. 90 %. Die Fehlerquelle scheint daher nicht in der Methode zu liegen, sondern in der mangelnden Stabilität des Methyl-Elenolactams. Aus diesem Grund ist die Methode der dc-Trennung und Elution für eine Gehaltsbestimmung in dieser Form wenig geeignet.

2.7 Versuch zur Reduktion von Methyl-Elenolactam

Nach der Hypothese für die Bildung eines Alkaloids aus einer genuinen Aldehydkomponente und einem Amin unter Azomethin-Bildung sollte aus Olea-Extrakten erst dann ein echtes Alkaloid faßbar werden, wenn die Doppelbindung der Azomethin-Gruppe reduziert worden ist. Um kennenzulernen, wie sich ein derartiges Produkt dc verhält, wurde Methyl-Elenolactam mit Natriumborhydrid drei Stunden bzw. sechzehn Stunden (über Nacht) lang reduziert und mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Danach konnte jeweils ein neues Produkt mit Dragendorff-positiver Reaktion detektiert werden. Im Fließmittel Toluol/Rotisol 7:3 liegt das Alkaloid unterhalb von Methyl-Elenolactam, die Bande ist nicht scharf begrenzt. Die Substanz fluoresziert bei 365 nm stark hellblau und bewirkt bei 254 nm eine Fluoreszenzminderung. Nach drei Stunden Reaktionszeit beträgt das Verhältnis neue Substanz zu Methyl-Elenolactam etwa 1:1, während nach einer Einwirkung von Natriumborhydrid über Nacht praktisch nur noch das Reduktionsprodukt gefunden wird. Das Produkt läßt sich nicht mit Ether oder Chloroform aus saurem Milieu ausschütteln. In Ammoniak-Atmosphäre zeigt das neue Produkt im gleichen Fließmittel ein echten Alkaloiden typisches Fließverhalten und findet sich im oberen Rf-Bereich. Abbildung 15 zeigt ein DC der Reduktionsprodukte.

Abb. 15: DC der Reduktionsprodukte von Methyl-Elenolactam
Fließmittel Toluol/Rotisol 7:3, Detektion mit
Dragendorff-Reagenz



1 Vergleich
2 Reduktionsdauer 3 Stunden
3 Reduktionsdauer 16 Stunden
4 Blindversuch

Dragendorff-positiv

und schwach Dragendorff-positiv

.... schwach gelbe Fluoresz.

2.8 DC-Eigenschaften weiterer Elenolactam-Derivate

Außer Methylamin wurden Ethyl- und Propylamin sowie Benzylamin und Phenylethylamin als Reaktionspartner zur Elenolactam-Bildung eingesetzt. Die Versuche wurden sowohl mit gereinigtem Olea-Extrakt als auch mit Calcium-Elenolat durchgeführt. Stets werden Elenolactame erhalten, die sich dc im lang- und kurzwelligen UV-Licht sowie im Tageslicht identisch verhalten. Alle zeigen gelbe Fluoreszenz bei 365 nm, Fluoreszenzminderung bei 254 nm und gelbe Farbe bei Tageslicht. Sie unterscheiden sich im Rf-Wert.
Von den biogenen Aminen Tyramin, Tryptamin, Dopamin, Noradre-

nalin und Serotonin reagieren alle außer Noradrenalin zu Elenolactam-Derivaten. Bemerkenswert ist, daß die Reaktionsprodukte im langwelligen UV-Licht blau fluoreszieren. Eine Ausnahme macht Tyramin, dessen Reaktionsprodukt gelb fluoresziert. Die Rf-Werte und das Verhalten im UV-Licht sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tab. 5: Rf-Werte und Fluoreszenzfarben der Reaktionsprodukte von gereinigtem Olea-Extrakt mit primären Aminen Fließmittel Toluol/Rotisol 7:3

Eingesetztes Amin	Rf-Wert des Elenolactams	Fluoreszenzfarbe bei 365 nm
Methylamin	0.34	gelb
Ethylamin	0.44	gelb
Propylamin	0.50	gelb
Benzylamin	0.61	gelb
Phenylethylamin	0.58	blau
Tyramin	0.54	gelb
Dopamin	0.69	blau
Tryptamin	0.79	blau
Serotonin	0.71	blau

Die Reaktionen mit Diethylamin sowie mit Adrenalin verliefen negativ. Dies erscheint verständlich, wenn man sich den postulierten Reaktionsablauf ansieht, nach dem sekundäre Amine anders reagieren müssen (Bildung von Enaminen). Adrenalin ist für die hier gewählten Reaktionsbedingungen wahrscheinlich zu instabil. Der Reaktionsansatz färbte sich nach wenigen Minuten tiefrot; es ist anzunehmen, daß Adrenochrom entsteht.

Ein Hydrazin-Zusatz zum Normalansatz verhindert die Bildung von Methyl-Elenolactam. Anstelle von Methyl-Elenolactam wird bei höherem Rf-Wert (0.4) eine schwach Dragendorff-positive Bande detektiert. Um diesen Befund abzusichern, wurde einem Normalansatz anstelle von Methylamin in gleicher Konzentration Hydrazin zugesetzt (0.65 mM). Parallel dazu wurde ein

Ansatz ohne extrahierte Droge mit Hydrazin inkubiert. Die Ergebnisse bestätigten, daß bei Einsatz von Hydrazin anstelle von Methylamin das Reaktionsprodukt bei Rf 0.4 sowohl mit als auch ohne Zusatz von extrahierter Droge als Enzymträger entsteht. Zur Bildung des Reaktionsprodukts mit Hydrazin ist eine Oxidation also nicht notwendig.

3. UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG DES REAKTANDEN FÜR DIE METHYL-ELENOLACTAM-BILDUNG

Für die Natur des Reaktanden gab es vor der Strukturaufklärung von Methyl-Elenolactam wenige Anhaltspunkte, die Vorversuche gestatteten lediglich folgende Schlüsse:

- Der Reaktand ist wasserlöslich,
- er besitzt keinen phenolischen Charakter,
- er stellt nicht das Oleuropein dar.

Im bereits gereinigten Extrakt sind zahlreiche Stoffgruppen vorhanden, in denen möglicherweise der Reaktand vorkommt, so zum Beispiel:

- Niedermolekulare Saccharide,
- andere Iridoide als Oleuropein,
- Alkaloide, Aminosäuren, Säuren u. v. a.

Analog zur Entstehung von einigen Alkaloiden durch Aldehydaminierung während der Biosynthese lag möglicherweise eine Carbonylfunktion im Molekül vor (MOTHES und SCHÜTTE 1969, CORDELL 1974, BROWN und LEONARD 1978 u. a.). Wegen der vielfältigen Möglichkeiten wurden darum unterschiedliche Methoden zur Extraktfraktionierung getestet. Außer oben genannter theoretischer Möglichkeit des Vorhandenseins einer Carbonylfunktion boten sich keine charakteristischen funktionellen Gruppen zum Nachweis des Reaktanden an. Bei orientierenden DC-Untersuchungen auf Kieselgelplatten in verschiedenen Fließmitteln mit anschließender Detektion mit 2.4-DNPH-Eisessig-Salzsäure-Reagenz (STAHL 1970) gelang es jedoch nicht eindeutig, Carbonylverbindungen nachzuweisen, was gegen die Beteiligung der Elenolsäure an der Reaktion sprach.

3.1 Extraktfraktionierung durch Löslichkeitsversuche

Zur besseren Handhabung für die DC sollte der Standardextrakt in Ethanol überführt werden. Dabei fielen große Mengen eines teils klebrigen, teils kristallinen weißen Niederschlags an, der sich schlecht abtrennen ließ. Nach Reinigung des in Wasser gelösten Niederschlags mit Aktivkohle und Behandlung

mit Ethanol bzw. Einengen der wäßrigen Lösung ließen sich zwei Substanzen differenzieren: Weiße, leichte, dünne Nädelchen von süßem Geschmack, die dc als Mannit identifiziert werden konnten und große, glasige Kristalle, die salzig-bitter schmeckten und bis 350°C nicht schmolzen. Die Prüfung auf anorganische Salze zeigte positive Reaktionen auf Kalium, Sulfat und Phosphat. Somit ist die gesuchte Substanz nicht mit Ethanol aus dem Standardextrakt ausfällbar. Der Extrakt kann aber durch Ethanolzugabe von weiteren Ballaststoffen befreit werden. Im folgenden wurde die Löslichkeit des Reaktanden innerhalb der eluotropen Reihe bestimmt, um ihn möglicherweise aus wäßriger Lösung ausschütteln zu können. Dabei zeigte sich eine wesentlich höhere Affinität zu polaren Lösungsmitteln. Der Reaktand ist außer in Wasser und in Ethanol gut löslich in Methanol, Isopropanol und Propanol, Butanol sowie in Aceton. Mit Ethylacetat, Methylethylketon, Diethylether, Chloroform, Dichlormethan, Hexan, Benzin und Petrolether war ein Ausschütteln aus wäßriger Lösung nicht möglich. Dies gelang auch nicht aus saurem (pH 3) oder alkalischem (pH 8) Milieu. Es blieb zunächst nur die Möglichkeit, kleinere Extraktmengen durch Zugabe eines hundertfachen Überschusses von Ethanol, Methanol, Isopropanol oder Aceton von den oben genannten Substanzen zu reinigen. Für die auf diese Weise gereinigten Extrakte wurden unökonomisch hohe Alkohol- oder Acetonmengen benötigt. Daraufhin wurde auf chromatographische Methoden übergegangen.

3.2 Chromatographische Verfahren zur Extraktfraktionierung

3.2.1 Dünnschicht- und Säulenchromatographie

Die Untersuchungen erfolgten mit kleinen Mengen des mit Ethanol gereinigten Extraktes auf DC-Platten. Von den geprüften Fließmitteln wurde mit Gemischen von Toluol/Rotisol und Aceton/Chloroform/Wasser eine relativ gute Trennung der durch UV-Fluoreszenzminderung sichtbaren Bestandteile erreicht. Bei dem im System Aceton/Chloroform/Wasser aufgetrennten Extrakt

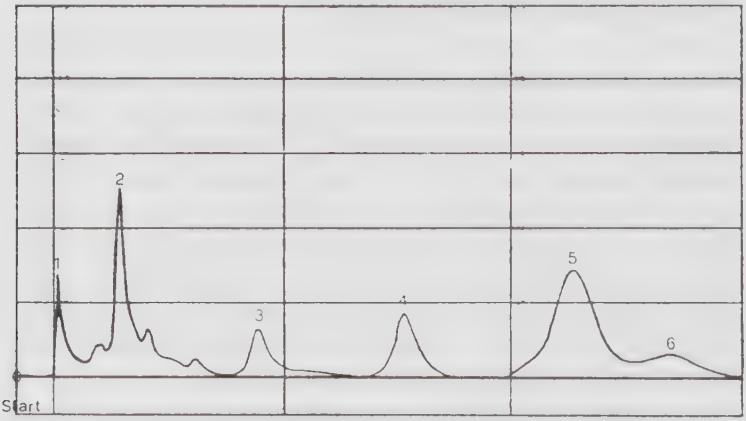
deuteten sich nach Behandlung mit 2.4-DNPH-Reagenz (STAHL) schwache gelb-orange Banden im mittleren Rf-Bereich an. Da die aufgetragenen Mengen jedoch für die Methyl-Elenolactam-Bildung nicht ausreichten, wurden die Versuche auf Dickschichtplatten fortgesetzt. Die aufgetragene Extraktmenge entsprach etwa 1 g Droge. Die Zonen im mittleren Rf-Bereich wurden abgehoben und mit Ethanol eluiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde mit dem Trockenrückstand die Methylamin-Reaktion durchgeführt, die zwar schwach, aber eindeutig positiv ausfiel. Versuche, die dc-Trennung auf die Säulenchromatographie zu übertragen, brachten keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Ebenfalls ergaben die Chromatographie über Ionenaustauscher und Dextrangel nicht die angestrebte Abtrennung bzw. Anreicherung des Reaktanden.

3.2.2 Reverse-Phase-Chromatographie

Für die Isolierung polarer Substanzen, wie sie hier vorzuliegen scheinen, eignet sich die Umkehrphasen-Chromatographie (Reverse-Phase-Chromatographie). In diesem Fall ist die mobile Phase stärker polar als die stationäre Phase. Sie wurde unter anderem erfolgreich zur Isolierung von Iridoid- und Secoiridoid-Glykosiden eingesetzt (STICHER, MEIER 1978). Bevor im präparativen Maßstab Fertigsäulen eingesetzt wurden, fanden Voruntersuchungen zur Wahl des geeigneten Fließmittels durch Auftrennen von Sephadex-gereinigten Extrakten über HPLC (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie) statt. Detektiert wurden die fluoreszenzmindernden Banden mit einem Spektrophotometer bei 254 nm. Zur Anwendung kamen Methanol-Wasser-Gemische mit Ameisen-, Essig- und Phosphorsäure-Zusatz sowie Acetonitril-Wasser-Gemische. Während letztere zu unkontrollierbaren Reaktionen mit dem Extrakt führten (Blaufärbung), eigneten sich Methanol-Wasser-Gemische gut zur Trennung. Je geringer der Methanol-Gehalt war, um so besser war die Trennung. Die besten Ergebnisse wurden mit 5 % Methanol/0.05 M-Phosphorsäure erzielt. Die guten Trennergebnisse ließen sich auch im größeren Maßstab nachvollziehen. Nach dem Entfernen des Hauptanteils der Ballaststoffe mit dem

oben genannten Fließmittel ließ sich der Reaktand mit einem Fließmittel mit höherem Methanol-Gehalt von der Säule waschen (Methanol 60 %/0.05 M-Phosphorsäure). Wurde die Reaktand-haltige Fraktion danach sofort der Reaktion mit Methylamin zugeführt, entstand auch Methyl-Elenolactam. Die Isolierung auf diesem Wege ergab die Erkenntnis, daß der Reaktand im Medium des Fließmittels vergleichsweise instabil ist. Bereits nach Aufbewahrung über Nacht im Kühlschrank konnte Methyl-Elenolactam aus den Reaktand-haltigen Fraktionen nicht mehr dargestellt werden. Versuche, die Fraktion zu stabilisieren (u. a. Oxidationsschutz mit Ascorbinsäure) waren nicht erfolgreich.

Abb. 16: Auftrennung eines Sephadex-gereinigten Olea-Extrakts über HPLC; Fließmittel Methanol 5 %/0.05 M-Phosphorsäure, Detektion UV-Licht 254 nm



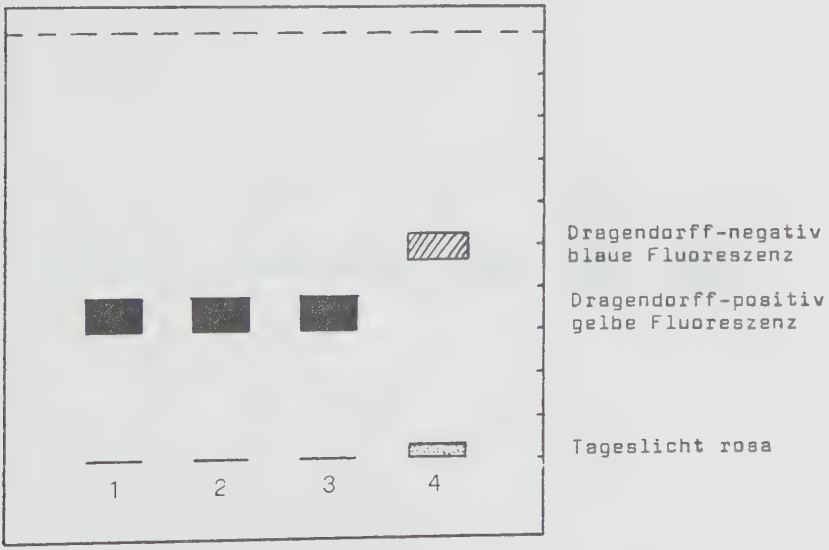
3.3 Versuche zur hydrolytischen Freisetzung des Reaktanden aus Olea-Extrakten

Die Struktur von Methyl-Elenolactam wies auf die Möglichkeit hin, daß es sich bei dem Reaktanden doch um ein Iridoid handelt. Andererseits war, wie bereits erwähnt, in den Voruntersuchungen sichergestellt worden, daß der Reaktand nicht Oleuropein ist. Die folgenden Untersuchungen sollten Klarheit bringen, ob Hydrolyseprodukte des Oleuropeins oder eines anderen Iridoidglykosids der Droge den Reaktanden darstellen.

3.3.1 Hydrolyse unter Säure- bzw. Baseneinwirkung

Der Extrakt wurde mit 1 N-HCl bzw. mit 1 N-NaOH zu gleichen Teilen versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur und bei 37°C stehen gelassen bzw. geschüttelt. Die Ansätze wurden neutralisiert und in gewohnter Weise der Reaktion mit Methylamin unterworfen. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 17. Stehen über Nacht bei Raumtemperatur und Schütteln bei 37°C mit 1 N-HCl führten nicht zur Erhöhung der Reaktandenmenge, beeinträchtigt aber auch nicht die Ausbeute; somit ist der Reaktand

Abb. 17: DC-Schema der Reaktionsprodukte mit Methylamin nach Hydrolyse eines gereinigten Olea-Extraktes mit Säure/Base; Fließmittel Toluol/Rotisol, Detektion mit Dragendorff-Reagenz und bei 365 nm



1 Extrakt + 1 N-HCl, Raumtemperatur, 16 Stunden
2 Extrakt + 1 N-HCl, 37°C, 16 Stunden
3 Vergleich (Standardansatz)
4 Extrakt + 1 N-NaOH, 37°C, 16 Stunden

in diesem Milieu stabil. Bei Einwirkung von 1 N-NaOH wird der Reaktand so verändert, daß keine Reaktion eintritt; demgemäß dürfte eine OH^--katalysierte Hydrolyse nicht infrage kommen. Anstelle von Methyl-Elenolactam erscheint eine bei Tageslicht nicht sichtbare, im langwelligen UV-Licht blau fluoreszierende Zone, die nicht mit Dragendorff-Reagenz reagiert.
Die folgenden Reaktionsbedingungen wurden drastischer gewählt: Der Extrakt wurde 5 und 10 Minuten sowie 1, 2 und 3 Stunden

Abb. 18: DC-Schema der Reaktionsprodukte mit Methylamin nach Hydrolyse eines gereinigten Olea-Extraktes durch Kochen mit 1 N-HCl; Fließmittel Toluol/ Rotisol 7:3, Detektion mit Dragendorff-Reagenz und bei 365 nm

1 5 Minuten
2 10 Minuten
3 1 Stunde
4 2 Stunden
5 3 Stunden

Dragendorff-positiv gelbe Fluoreszenz

Dragendorff-negativ blaue Fluoreszenz

Dragendorff-negativ hellblaue Fluoreszenz

lang mit 1 N-HCl gekocht. 5 - 10-minütiges Kochen beeinträchtigt die Stabilität des Reaktanden nicht, ab 1 bis 3 Stunden fällt die Reaktion zunehmend schwächer aus. Methyl-Elenolactam ist aber noch immer deutlich detektierbar. Bei den minutenlang aufgekochten Ansätzen erscheinen nach der Reaktion über dem Methyl-Elenolactam zusätzlich zwei blau fluoreszierende Zonen, die bei den 1 - 2 Stunden gekochten Ansätzen fehlen. Nach 3 Stunden erscheint der gleiche blaue Fleck wie bei der Hydrolyse mit NaOH (Abbildung 18).

3.3.2 Hydrolyse mit β-Glykosidase

Der Olea-Extrakt wurde eine Nacht lang mit β-Glukosidase in Acetat-Puffer pH 4.66 bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden Methylamin und Enzymträger zugesetzt und in üblicher Weise inkubiert. Es entsteht genausoviel Methyl-Elenolactam wie bei dem unbehandelten Vergleich. Dabei erscheinen zwei hellblau fluoreszierende Banden über Methyl-Elenolactam. Nach diesen Ergebnissen kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommem werden, daß es sich bei dem Reaktanden von vornherein um eine nichtglykosidische Verbindung handelt, die vergleichsweise säurestabil und basenlabil ist. Die Durchsicht der Literatur (EL-NAGGAR und BEAL 1980) wies auf Elenolid als nichtglykosidisches Iridoid, das die oben genannten Eigenschaften besitzen müßte. Somit wurde versucht, diese Substanz in die Hand zu bekommen.

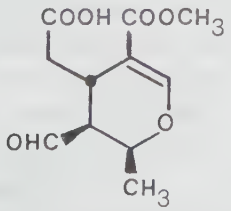


Abb. 19: Elenolid (nach EL-NAGGAR und BEAL 1980)

3.4 Nachweis von Elenolid bzw. Elenolsäure in gereinigtem Olea-Extrakt

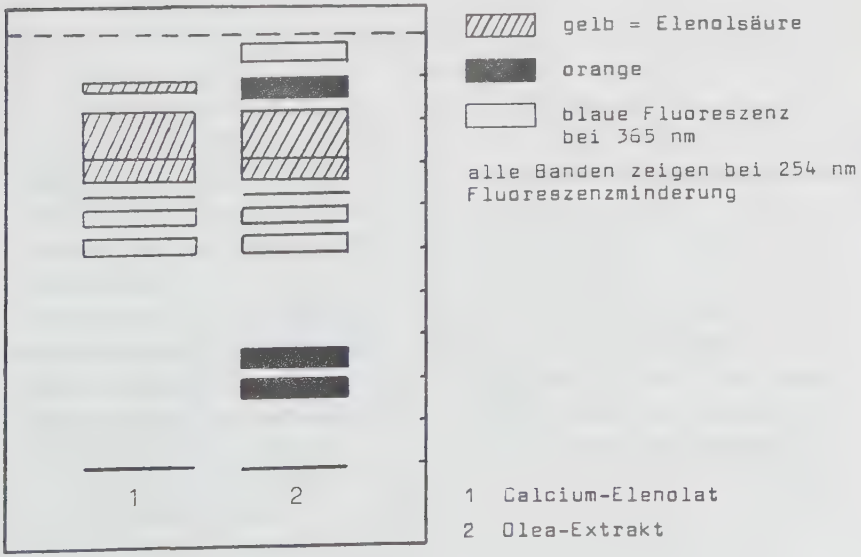
Elenolid fällt bei der Hochvakuumdestillation der Säurefraktion von Blättern, Zweigen und Früchten des Ölbaums an (VEER et al. 1957). Elenolid ist ein Artefakt, dessen biogenetischer Vorläufer wahrscheinlich Oleuropein darstellt (PANIZZI et al. 1958, 1960). Es sollte versucht werden, Elenolid ohne Destillation zu gewinnen. Dazu wurde die von BEYERMAN et al. 1961 beschriebene, für die technische Gewinnung vorgesehene Isolierungsmethode auf Labormaßstab zugeschnitten. Der gereinigte Olea-Extrakt wurde mit Salzsäure auf pH 1 gebracht - die Voruntersuchungen bewiesen ja die relativ hohe Stabilität gegenüber niedrigen pH-Werten - und mit Dichlormethan mehrere Tage perforiert. Dem eingeengten Dichlormethan-Extrakt wurde Diethylether zugefügt, bis kein Niederschlag mehr fiel und filtriert. Der Ether wurde getrocknet, der Abdampfrückstand in Wasser aufgenommen und die Reaktion mit Methylamin durchgeführt. Während der Etherauszug in vergleichsweise großer Menge Reaktand enthielt, war die Fällung Reaktand-frei. Die DC-Untersuchung der Etherlösung erbrachte nach Detektion mit 2.4-DNPH-HCl-Eisessig-Reagenz eine gelbe Hauptbande im oberen Rf-Bereich. Mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz zeigt sich nach Erwärmen eine dunkelgrau gefärbte Bande; vor dem Besprühen bewirkt die Bande im UV-Licht bei 254 nm Fluoreszenzminderung, sowie eine ganz schwache Fluoreszenz bei 365 nm. Die Frage, ob es sich um Elenolid handelt, konnte beantwortet werden, als wir in den Besitz des Calcium-Salzes der Elenolsäure gelangten. Die Vergleichs- und die Hauptbande des Olea-Ether-Auszuges zeigten im DC das gleiche Verhalten. Somit handelt es sich bei dem Reaktanden nicht um Elenolid, sondern um Elenolsäure, deren Lacton Elenolid ist.

3.5 Isolierung von Elenolsäure durch DCCC

Die gute Löslichkeit der Elenolsäure in Wasser, Ethanol und auch Diethylether ist eine gute Voraussetzung, die Abtrennung des Stoffes nach dem DCCC-Verfahren zu versuchen.

Zur Auswahl des geeigneten Fließmittelsystems wurde die bei HOSTETTMANN 1980 angegebene Methode benutzt: Die Probe wird mit der wassergesättigten organischen Phase des Fließmittel-Gemisches über DC-Platten aufgetrennt. Wenn der Rf-Wert der gesuchten Substanz über 0.5 liegt, wird die weniger polare organische Phase als mobile Phase benutzt. Bei polaren Substanzen - Rf-Wert unter 0.5 - wird die polare Phase als mobile Phase eingesetzt. Liegt der Rf-Wert zwischen 0.4 und 0.6, ist die Anwendung beider Phasen als mobile Phase möglich. Zunächst wurden ternäre Gemische aus Dichlormethan, Methanol und Wasser getestet. Zur Untersuchung kam das Dichlormethan-Perforat von einem angesäuerten gereinigten Olea-Extrakt. Aus einer Reihe von 12 Dichlormethan- bzw. Chloroform-Alkohol-Wasser-Gemischen kam schließlich ein Gemisch von Chloroform/Methanol/n-Propanol/Wasser im Verhältnis 5:6:1:4 zur Anwendung.

Abb. 20: DC-Schema eines zur DCCC-Verteilung vorbereiteten Olea-Extraktes; Fließmittel Chloroform/Methanol/n-Propanol/Wasser 5:6:1:4, Unterphase; Detektion mit 2.4-DNPH-HCl-Eisessig-Reagenz, UV-Licht



Die DC-Auftrennung eines zur DCCC-Verteilung vorbereiteten Dichlormethanextraktes ergab das unter Abbildung 20 gezeigte Bild. Wie das DC-Schema zeigt, stellt die Elenolsäure ein Gemisch dar. In der Diskussion werden die mesomeren Formen der Verbindung näher vorgestellt. Die Elenolsäure konnte nach 3 - 4-maligem DCCC-Durchlauf rein erhalten werden. Die Substanz ist dc reiner als die zur Verfügung stehende authentische Referenzsubstanz aus Calcium-Elenolat. Sie bildet eine farblose, viskose Flüssigkeit und läßt sich nicht kristallisieren. Durchschnittlich wurden aus den nicht vorbehandelten Blättern über 0.1 % gewonnen. Die Elenolsäure-Fraktion zeigt mit zunehmender Anreicherung auf der DC-Platte eine Differenzierung von einer zwar nicht scharfen, aber doch einheitlichen Bande zu drei sich überlappenden Banden, die im kurzwelligen UV-Licht fluoreszenzmindernd erscheinen. Die Trennung der Komponenten war auch bei DCCC-Fraktionierung in kleinsten Volumeneinheiten nicht möglich.

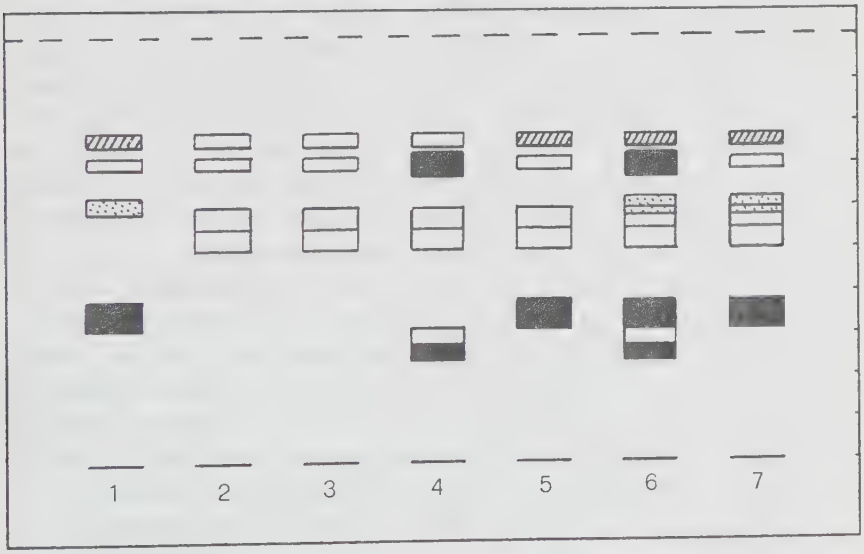
3.6 Versuche zur Ausbeute-Steigerung an Elenolsäure aus Olea-Extrakten

Die Ausbeute kann noch gesteigert werden, wenn die Droge vor der Extraktion bei niedrigem pH-Wert gekocht wird. Praktisch kann Oleuropein dann vollständig zu Elenolsäure hydrolysiert werden. Dies konnte bei Kochversuchen mit HCl/KCl-Puffer pH 1 gezeigt werden: Dc wurden Extrakte verglichen, die a) nach einstündigem Kochen mit Wasser und b) nach ein - bzw. zweistündigem Kochen mit Puffer hergestellt wurden. Während im Ansatz a) wenig Elenolsäure nachweisbar ist, enthalten die Ansätze b) vergleichsweise große Mengen. Dabei scheint nach zweistündigem Kochen nicht mehr Elenolsäure freigesetzt worden zu sein als im Ein-Stunden-Ansatz. Dafür lassen sich dc mehr Ballaststoffe nachweisen. Über die genauen Mengenverhältnisse von Elenolsäure in unbehandelter und hydrolysierter Droge siehe unter 4.

3.7 Versuche zur H^+-katalysierten Freisetzung von Elenolsäure aus Oleuropein

Um den Weg von Oleuropein zur Elenolsäure besser verfolgen zu können, wurden im folgenden Untersuchungen zum Abbau von Oleuropein unternommen.

Abb. 21: Reaktionsprodukte von Oleuropein und gereinigtem Olea-Extrakt mit Methylamin vor und nach saurer Hydrolyse unter verschiedenen Bedingungen; Fließmittel Toluol/Rotisol 7:3, Detektion mit Dragendorff-Reagenz und im UV-Licht



1 Olea-Extrakt (Vergleich)
2 Oleuropein
3 Oleuropein, 1 h 37°C
4 Oleuropein, 1 h 37°C, pH 1
5 Oleuropein, 1 h 100°C, pH 1
6 Oleuropein, 1 h 37°C, pH 1 +Olea-Extrakt
7 Oleuropein, 1 h 100°C, pH 1 + Olea-Extrakt

stark Dragendorff-pos.
schwach Dragendorff-p.
hellblaue Fluoreszenz
grünblaue Fluoreszenz

Oleuropein wurde eine Stunde lang bei pH 1 bei 37°C gehalten. Anschließend wurde mit Diethylether ausgeschüttelt, zur Trockne gebracht und die Reaktion mit Methylamin durchgeführt. Die Wasserphase gelangte ebenfalls zur Reaktion. Auf dem DC der Reaktionsprodukte der Etherphase wurden zwei Dragendorff-positive Produkte detektiert, die aber nicht dem Methyl-Elenolactam entsprechen. Die Reaktion der Wasserphase mit Methylamin erbrachte keine Dragendorff-positiven Produkte. Unter diesen Bedingungen entsteht also aus Oleuropein nicht der Elenolactam-Reaktand. Wenn Oleuropein eine Stunde lang bei pH 1 unter Rückfluß gekocht wurde und anschließend der Ansatz mit Ether ausgeschüttelt wird, ist mit 2.4-DNPH-Reagenz Elenolsäure deutlich nachweisbar. Die Reaktion mit Methylamin ergibt in vergleichsweise großem Umfang Methyl-Elenolactam. Außerdem stellt sich eine schwach Dragendorff-positive Bande bei Rf 0.69 dar, diese zeigt Fluoreszenzminderung bei 254 nm und eine türkise Fluoreszenz bei 365 nm. Die nach Hydrolyse bei 37°C erhaltenen Reaktionsprodukte fehlen. Nach Kochen mit Säure ist Oleuropein nicht mehr nachweisbar.
Um Kenntnis darüber zu erlangen, was mit Oleuropein unter physiologischen Bedingungen geschieht, wurde es auch eine Nacht lang bei 37°C in künstlichem Magensaft (USP XX) gehalten. Nach der Reaktion des Ansatzes mit Methylamin wurden die gleichen Reaktionsprodukte erhalten wie bei saurer Hydrolyse bei 37°C sowie wenig Methyl-Elenolactam. Abbildung 21 zeigt die Reaktionsprodukte von Oleuropein und gereinigtem Olea-Extrakt vor und nach der Hydrolyse unter verschiedenen Bedingungen.

3.8 Versuche zur Hydrazon-Bildung mit Elenolsäure

3.8.1 Umsetzung mit 2.4-Dinitrophenylhydrazin

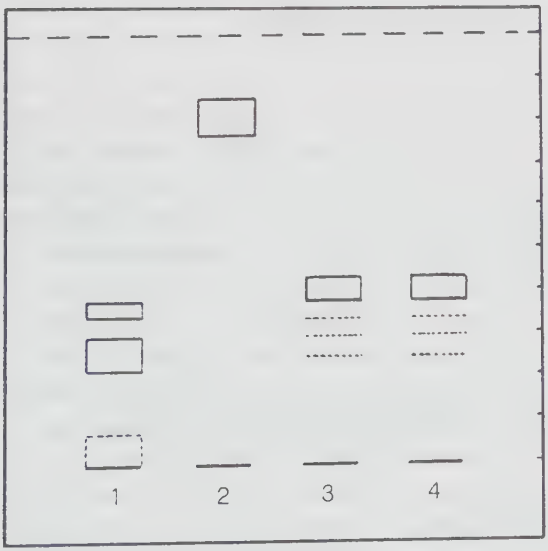
2.4-DNPH-HCl-Eisessig-Reagenz nach STAHL eignet sich, wie gezeigt, gut zum Nachweis der Elenolsäure. Deshalb wurde versucht, 2.4-Dinitrophenylhydrazone präparativ zu gewinnen. Nach dem von WINTERFELD angegebenen allgemeinen Verfahren wurden etwa 100 mg der über DCCC gewonnenen Substanz umge-

setzt. Sofort bildete sich ein gelb gefärbter Niederschlag. Die DC-Untersuchung erbrachte das Vorliegen von 9 Banden, ohne daß eine Hauptkomponente festgestellt werden konnte, deren Isolierung anzustreben gewesen wäre.

3.8.2 Umsetzung mit Phenylhydrazin

Bei PANIZZI et al. findet sich eine Vorschrift zur Umsetzung des öligen Methylesters, der nach saurer Hydrolyse von Oleuropein gefunden wurde, mit Phenylhydrazin. Nach dieser Vor-

Abb. 22: DC-Schema der Phenylhydrazone von Elenolsäure und Calcium-Elenolat;Fließmittel Toluol/Rotisol 9:1, Detektion mit 2.4-DNPH-Reagenz



1 Elenolsäure aus Calcium-Elenolat (gelb)
2 Phenylhydrazin (braun)
3 Phenylhydrazon von Elenolsäure aus DCCC-Gewinnung (braun)
4 Phenylhydrazon von Elenolsäure aus Calcium-Elenolat (braun)

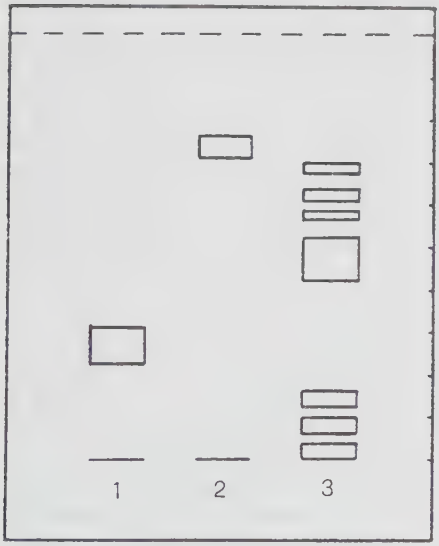
schrift wurden 80 mg der selbst isolierten Elenolsäure parallel zu authentischem Calcium-Elenolat umgesetzt. Bei beiden Ansätzen fand sofort eine weiße Fällung statt, die aus absolutem Ethanol umkristallisiert wurde. Es bildeten sich seidenglänzende weiße Blättchen mit dem Schmelzpunkt 171 -174°C. PANIZZI et al. geben den Schmelzpunkt mit 172 - 173°C an, spektroskopische Angaben fehlen. Die dc-Untersuchung der Kristalle zeigte, daß das Hydrazon geringgradig verunreinigt war. Es wurde versucht, den Hauptfleck dc zu isolieren. Nach dem Eluieren der Substanz aus der entsprechenden Kieselgelzone und erneuter dc-Überprüfung entstanden jedoch wieder die gleichen Banden wie auf dem ersten DC. Auf eine weitere Untersuchung des Kristallgemisches wurde verzichtet. Das DC-Schema der Phenylhydrazone von Elenolsäure zeigt Abbildung 22.

3.8.3 Umsetzung mit p-Nitrophenylhydrazin

Normalerweise bestehen wenig Gründe, p-Nitrophenylhydrazonen den 2.4-Dinitrophenylhydrazonen als Aldehydderivate zum Zweck der Identifizierung den Vorzug zu geben. Eine Ausnahme ist die Bildung polymorpher Fällungen mit 2.4-DNPH, wie sie wahrscheinlich im vorliegenden Fall auftreten. Die Umsetzung nach BAUER-MOLL von etwa 100 mg Elenolsäure aus DCCC-Gewinnung in verdünnter Essigsäure mit p-NPH-Reagenz führte zu einer Haupt- und sechs Nebenbanden (Abbildung 23 a). Die Hauptkomponente konnte sc über Kieselgel isoliert werden (Abbildung 23 b); schon beim Entfernen des Elutionsmittels fielen dunkelrote Kristalle aus. Diese wurden aus Ethylacetat umkristallisiert. Sie schmelzen bei 220°C. Für die Hauptkomponente wurde die Strukturformel Abbildung 24 vermutet, das Molekulargewicht müßte demnach 377 sein. Bevor eine Verbrennungsanalyse durchgeführt wurde, erfolgten spektroskopische Untersuchungen der roten Kristalle. Die Absorptionsspektren des Hydrazon-Gemisches und der Hauptkomponente sind in Abbildung 25 einander gegenübergestellt; das IR-Spektrum der roten Kristalle zeigt Abbildung 26.
Schon das IR-Spektrum brachte Zweifel an der vermuteten

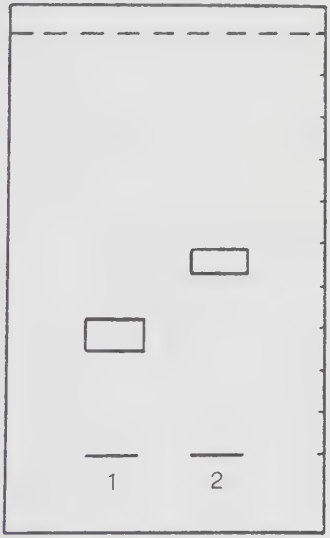
Abb. 23: DC-Schemata der p-Nitrophenylhydrazone der Elenolsäure; Detektion im Tageslicht und bei 254 nm

a) vor Säulenchromatographie
Fließmittel Toluol/Rotisol 9:1



1 Elenolsäure (fluoreszenzmindernd)
2 p-NPH (orange)
3 Derivate (orange)

b) nach Säulenchromatographie
Fließmittel Toluol/Chloroform/Eisessig 8:1:1



1 Hauptkomponente (orange)
2 p-NPH (orange)

alle Banden bewirken Fluoreszenzminderung

Abb. 24: Vermutete Strukturformel für die Hauptkomponente der p-Nitrophenylhydrazone der Elenolsäure (rote Kristalle), Summenformel $C_{17}H_{19}N_3O_7$

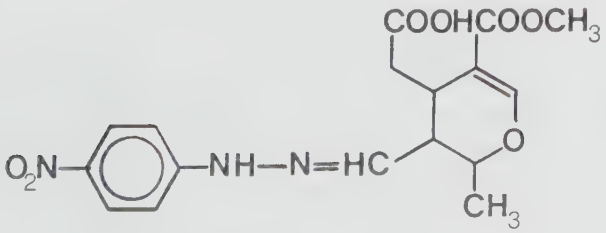
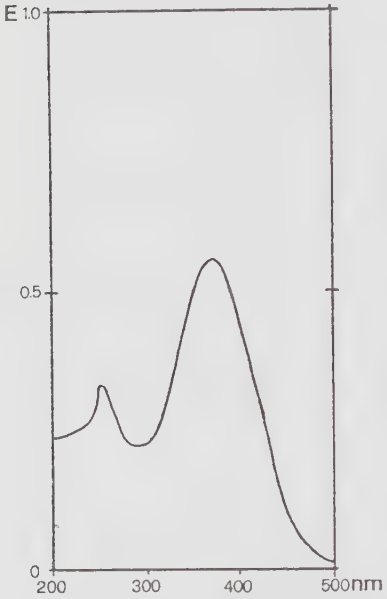


Abb. 25: Absorptionsspektren der p-Nitrophenylhydrazone der Elenolsäure (in Ethylacetat)

a) Gemisch der Hydrazone
Absorptionsmaxima bei
255 und 375 nm



b) Hauptkomponente
Absorptionsmaxima bei
250 und 420 nm

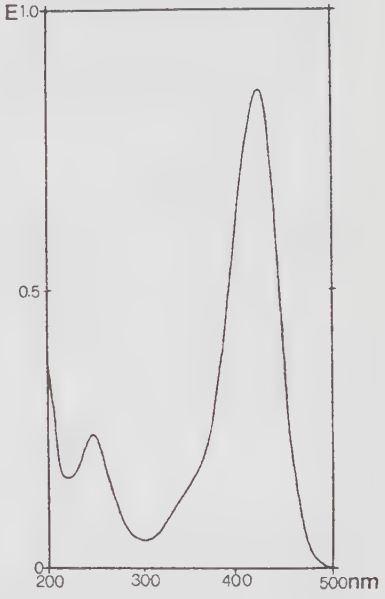
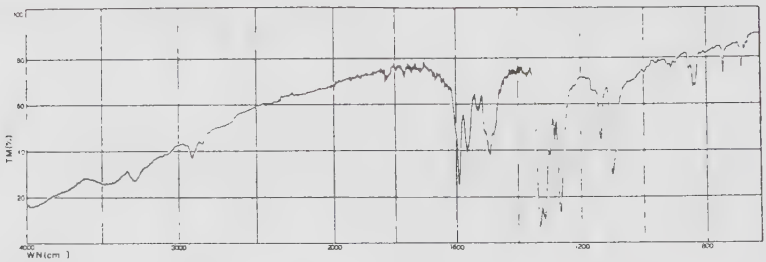


Abb. 26: IR-Spektrum der Hauptkomponente der p-Nitrophenylhydrazone der Elenolsäure



Banden bei: 3500/3300 cm^{-1} (breit), 2900/2850 cm^{-1} (breit), 1590 (m), 1560 (m), 1530 (w), 1500 (m), 1330 (s), 1320 (s), 1285 (w). 1270 (s), 1140 (m), 1100 (m), 840/830 (w), 790 (w), 685 cm^{-1} (w).

Struktur für die Hauptkomponente. Die Existenz des p-Nitrophenylhydrazon-Anteils kann zwar bestätigt werden, durch Banden bei 1590, 1560 und 1500 cm^{-1}, die auf den Aromaten hinweisen. Banden bei 1530 und 1330 cm^{-1} deuten auf die Nitro-Gruppe, breite Banden bei 3500 bis 3300 cm^{-1} auf die NH-N=C-Gruppierung. Bei 2900 bis 2800 cm^{-1} treten C=H-Valenzschwingungen auf. Was mit dem Iridoidanteil des Moleküls passiert ist, bleibt unklar. Es fehlen Banden, die eindeutig auf den Ester sowie die Carboxylgruppe hinweisen. Im ^{1}H-NMR-Spektrum ließen sich die Protonen des aromatischen Teils zuordnen.
Hinweise auf eine mögliche Struktur konnte auch ein Hochauflösungsmassenspektrum nicht erbringen. Der zu erwartende Molekülpeak bei m/e 377 ist nicht vorhanden. Der base-peak liegt bei m/e 286 und ein weiteres intensives Signal bei m/e 91. Rein rechnerisch könnten beide Bruchstücke das vermutete Molekulargewicht ergeben. Für das Bruchstück m/e 91 wird die Summenformel C_7H_7 vorgeschlagen, die theoretisch einem Tropylium-Ion entsprechen könnte, das auf den Aromaten hinweist. Dem entspricht die Summenformel $C_{10}H_{12}N_3O_7$ für m/e 286. Beide Bruchstücke könnten jedoch nur entstehen, wenn eine gleichzeitige Wanderung der Nitro- und einer Methylgruppe möglich wäre.
Bei der Zusammenfassung aller Informationen, die aus den spektroskopischen Untersuchungen gewonnen werden konnten, muß davon ausgegangen werden, daß zwar ein p-Nitrophenylhydrazon entstanden ist, jedoch nicht von der intakten Elenolsäure.
Da die Umsetzung der Elenolsäure mit p-NPH quantitativ erfolgte, wurde die Bildung des Derivat-Gemisches zur Gehaltsbestimmung der Elenolsäure herangezogen.

4. VERSUCHE ZUR PHOTOMETRISCHEN BESTIMMUNG VON ELENOLSÄURE

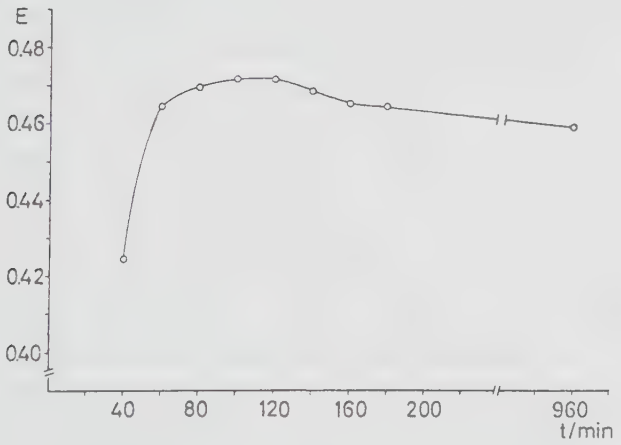
Unser Ziel war, Aufschluß über das Verhältnis der Menge an Elenolsäure in der Droge vor und nach der Hydrolyse von Oleuropein zu bekommen. Wie in der Diskussion gezeigt wird, ist Elenolsäure nicht als einheitliche Substanz anzusehen, sondern liegt nach ihrer Freisetzung in verschiedenen tautomeren Formen vor, die Mono- und Dialdehyde sowie deren Enole darstellen. Es wird deshalb vorgeschlagen, die Substanz als Elenolsäure-Komplex zu bezeichnen und zu bestimmen.

4.1 Bestimmung von Calcium-Elenolat

In Anlehnung an eine Versuchsanordnung zur Bestimmung von Vanillin und p-Hydroxybenzaldehyd (BAUER-MÖLL) bieten sich für die photometrische Bestimmung die Umsetzungen mit 2.4-DNPH oder p-NPH an. Beide Reagenzien bilden mit Elenolsäure stark gelb bis orange gefärbte, wasserunlösliche Derivate, die aus dem Ansatz abgetrennt, nach Reinigung in organischem Lösungsmittel aufgelöst und photometrisch bestimmt werden können. Die nach diesem Verfahren erhaltenen Werte waren nicht reproduzierbar, da die Fällung schlecht abzutrennen und zu waschen war. Auffällig war jedoch bei diesen Versuchen, daß die Farbintensität der Reaktionslösungen konzentrationsabhängig war, bevor ein Niederschlag entstand. So wurde die Bestimmung in einer solchen Verdünnung ausgeführt, daß eine Fällung ausblieb.
Die Bestimmung mit p-NPH in 1 N-HCl lieferte reproduzierbare Werte. Der gebildete Farbkomplex hat ein Maximum zwischen 392 und 405 nm (bathochrome Verschiebung bei steigender Konzentration). Bei der Messung bei 400 nm wurden im Konzentrationsbereich von 0.05 bis 0.6 mg/10 ml Meßlösung linear ansteigende Werte erreicht. Innerhalb dieses Bereiches liegen die Extinktionen zwischen 0.070 und 0.940, wenn nach einer Reaktionszeit von 100 bis 120 Minuten gemessen wird. Die Bildung des Hydrazons und damit die Ausprägung der Farbe

sind zeitabhängig. Von 0 - 60 Minuten steigt die Extinktion steil an; innerhalb von 60 - 180 Minuten weichen die niedrigsten Extinktionswerte lediglich 1.5 % vom Maximalwert ab, innerhalb von 100 - 120 Minuten sind die Werte gleichbleibend. Nach drei Stunden fallen die Werte sehr langsam wieder ab. Der optimale Meßzeitpunkt liegt damit zwischen 100 und 120 Minuten.

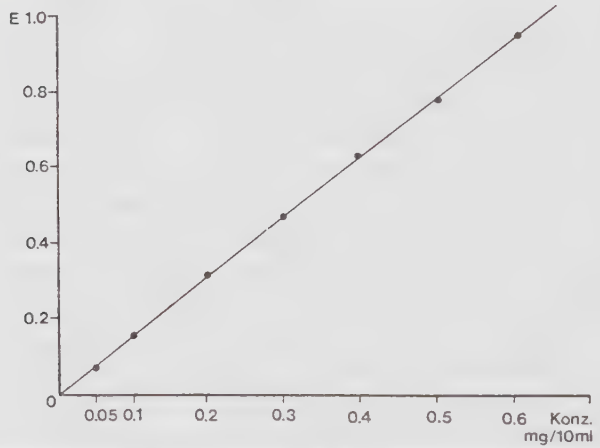
Abb. 27: Änderung der Extinktion im Verlauf der Zeit
Konzentration: 0.3 mg Calcium-Elenolat + 1 ml p-NPH-Reagenz 0.1 % ad 10 ml N-HCl



Zeit/min	Extinktion bei 400 nm
40	0.425
60	0.465
80	0.470
100	0.472
120	0.472
140	0.469
160	0.466
180	0.465

Die Eichwerte wurden wie folgt aufgenommen: Mit Stammlösungen von 5 bzw. 10 mg Calcium-Elenolat/100 ml 1 N-HCl wurde der Konzentrationsbereich zwischen 0.05 und 0.6 mg in 10 ml Meßlösung erfaßt. Als Reagenz diente eine 0.1 %ige Lösung von p-NPH in 1 N-HCl. Gemessen wurde bei 400 nm nach einer Reaktionszeit von 2 Stunden. Die Stammlösungen mußten täglich frisch bereitet werden, da bereits nach 24 Stunden wesentlich niedrigere Konzentrationen gefunden wurden. Die gefundenen Meßwerte sind der Konzentration proportional, sie ergeben bei graphischer Darstellung eine Gerade.

Abb. 28: Eichgerade von Calcium-Elenolat; Konzentration in mg/10 ml 1 N-HCl, gemessen bei 1 cm Schichtdicke. $\log \varepsilon = 3.91$, $E^{1\,\%}_{1\,cm} = 154$



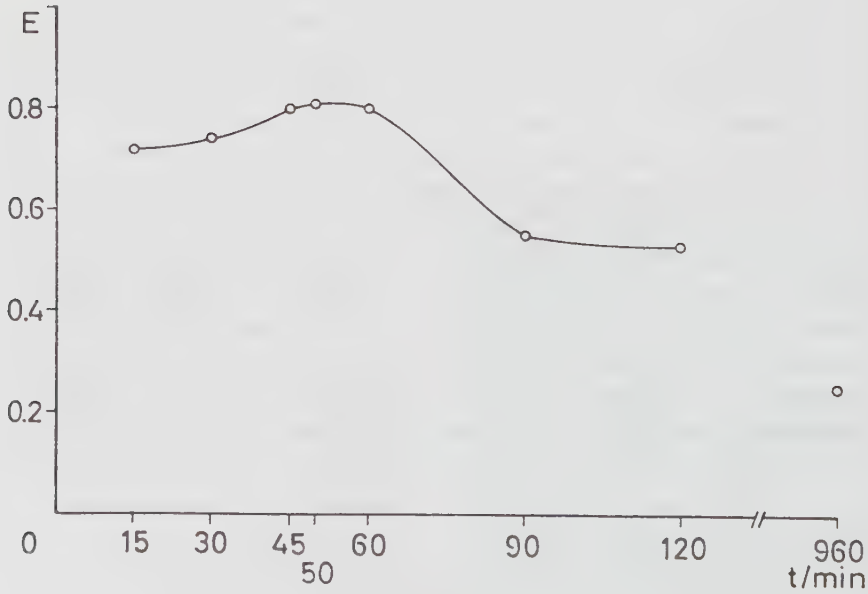
Ca-Elenolat-Konz. mg (mM)/10 ml	Mittelwerte n = 6	Niedrigst- bzw. Höchstwerte
0.05 (0.0096)	0.073	0.070 - 0.076
0.1 (0.0191)	0.154	0.150 - 0.158
0.2 (0.0382)	0.316	0.312 - 0.323
0.3 (0.0573)	0.469	0.465 - 0.474
0.4 (0.0764)	0.629	0.625 - 0.634
0.5 (0.0955)	0.774	0.770 - 0,780
0.6 (0.1146)	0.938	0.934 - 0.942

4.2 Bestimmung des Elenolsäure-Komplexes in Olea-Extrakten

Im wesentlichen wurden die Untersuchungen analog der Bestimmung von authentischem Calcium-Elenolat durchgeführt. Um die geeignete Drogenmenge zu ermitteln, wurde der gereinigte Olea-Extrakt verwendet. Dabei zeigte sich, daß auch andere Bestandteile des Extraktes bei 400 nm eine geringe Absorption hatten. Diese betrug jedoch in jedem Fall weniger als 4 % der Extinktion, die p-NPH durch Reaktion mit dem vorhandenen Elenolsäure-Komplex ergab. Um diesen Fehler auszuschalten, wurde jeweils die Absorption des Extraktes bei 400 nm ohne Reagenzzugabe gemessen und der Wert bei der Berechnung des Gehalts berücksichtigt. Wegen der Instabilität von Elenolsäure in stark saurem Milieu ist die Droge jeweils frisch für die Bestimmung zu extrahieren. Als Extraktionsmittel kamen HCl/KCl-Puffer pH 1, 1 N-Salzsäure und Oxalsäure 0.1 % zur Anwendung. Bei der Extraktion mit HCl/KCl-Puffer und Oxalsäure wurde das dem Calcium-Elenolat/p-NPH-Derivat entsprechende Reaktionsprodukt erhalten, dessen Absorptionsmaximum bei 400 nm liegt; Oxalsäure lieferte um 10 % niedrigere Werte. Mit 1 N-HCl wurde ein anderes Reaktionsprodukt erhalten, das Absorptionsmaximum liegt bei 440 nm. Der günstigste Meßzeitpunkt lag ebenfalls bei 2 Stunden. Zur Ermittlung derjenigen Extraktionsdauer, die die höchsten Elenolsäure-Ausbeuten erbringt, wurde die Droge 15, 30, 45, 50, 60, 90 und 120 Minuten sowie über Nacht mit Puffer pH 1 bei 100°C extrahiert. Die höchsten Extinktionen wurden zwischen 45 und 60 Minuten (50 Minuten) gefunden. Zeiten von 90 Minuten und länger bewirken einen starken Abfall des Gehaltes an Elenolsäure-Komplex. Die Konzentrationen wurden anhand der Eichgeraden für Calcium-Elenolat direkt abgelesen. Berechnet als Calcium-Elenolat beträgt der Gehalt an Elenolsäure-Komplex bei der mit Säure extrahierten Droge über 1 %.

Abb. 29: Einfluß der Extraktionsdauer auf die Ausbeute an Elenolsäure-Komplex aus Olea-Droge in tabellarischer und graphischer Darstellung

Extraktionsdauer/min	Extinktion (n s. exp. T.)	Ca-Elenolat/mg/Ansatz (0.04 g)	Gehalt/%
15	0.720	0.46	1.15
30	0.740	0.48	1.2
45	0.800	0.50	1.25
50	0.809	0.54	1.35
60	0.800	0.50	1.25
90	0.550	0.35	0.875
120	0.530	0.34	0.85
Nacht	0.246	0.16	0.4



5. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE OXIDANTIEN ZUR METHYL-ELENOLACTAM-BILDUNG

5.1 Versuche zum Typus der Enzymbeteiligung

Wie bereits in den Voruntersuchungen gezeigt wurde, findet in Abwesenheit der Leerdroge eine Elenolactam-Bildung in nennenswertem Umfang nicht statt. Außerdem bleibt die Elenolactam-Bildung aus, wenn die Blattmasse in Wasser erhitzt wird. Da die Elenolactam-Bildung durch Eisen-(III)-Ionen stimuliert werden kann, liegt es nahe, eine zellgebundene Oxidase auf der Droge zu postulieren. Die Untersuchungen galten zunächst der Frage, ob anstelle von Eisen-(III)-Salzen auch andere Oxidationsmittel bzw. biochemische Elektronenacceptoren agieren können. In diesem Rahmen wurden die Pyridinnucleotide NAD und NADP sowie Meerrettich-Peroxidase eingesetzt. Mit allen Agenzien fällt die Reaktion positiv aus; das beste Resultat wird mit Meerettich-Peroxidase erzielt, darauf folgt NADP und an letzter Stelle NAD. Daraufhin wurden anstelle der extrahierten Olea-Droge Kaliumhexacyanoferrat(III), NAD, NADP und Meerettich-Peroxidase eingesetzt: Die Reaktion fällt auch ohne Zugabe der Olea-Droge bei allen Agenzien positiv aus, in der Reihenfolge Meerettich-Peroxidase, Eisen-(III), NADP und NAD. Demnach ist für die Bildung der Reaktionsprodukte die Anwesenheit eines oxidierenden Agens vorrangig, unabhängig davon, ob diese Komponente nun biologischer oder rein chemischer Natur ist. Ferner wurde gesichert, daß die Kombination der extrahierten Droge mit einem weiteren Oxidationsmittel nicht zur Erhöhung der Ausbeute an Methyl-Elenolactam führt. Versuche mit Elenolsäure bzw. mit Calcium-Elenolat ergaben die gleichen Ergebnisse. Eine Ausnahme bildeten die Reaktionen, an denen die Pyridinnucleotide beteiligt waren. Bei der Reaktion von Elenolsäure mit Methylamin nur mit Zusatz von NAD oder NADP wird Methyl-Elenolactam nicht gebildet. Die nachstehende Tabelle gibt eine Übersicht, unter welchen Bedingungen eine Bildung von Methyl-Elenolactam stattfindet.

Tab. 6: Bildung von Methyl-Elenolactam bei der Reaktion von gereinigtem Olea-Extrakt bzw. Elenolsäure (Calcium-Elenolat) mit Methylamin bei Einwirkung unterschiedlicher Oxidationsmittel

Oxidationsmittel	Olea-Extrakt	Elenolsäure
Leerdroge	+	+
Hexacyanoferrat(III)	+	+
Meerrettich-Peroxidase	+	+
NAD^+	+	-
$NADP^+$	+	-

5.2 Versuche zur Charakterisierung der zellgebundenen Olea-Oxidase

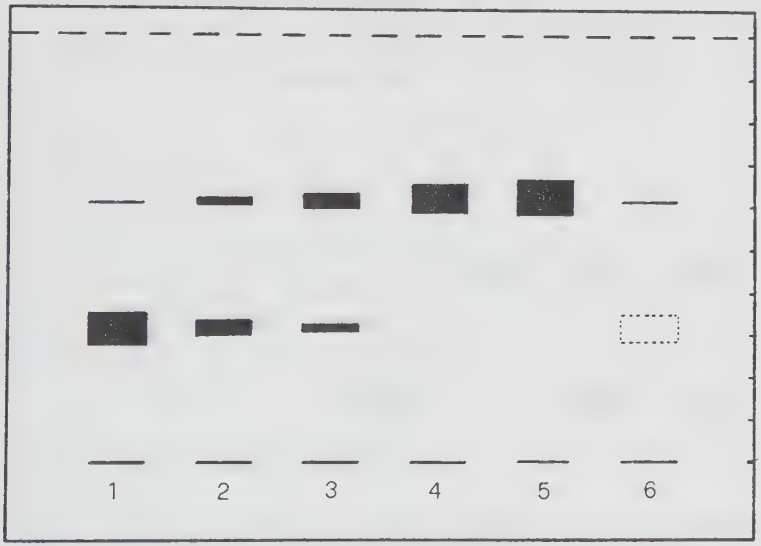
5.2.1 Hemmung durch Cyanid

Die Hemmung durch Cyanid ist für alle Protoporphyrinenzyme charakteristisch (MAHLER und CORDES 1967). Die Hemmung ist reversibel. Zur Hemmung sind 10^{-5} bis 10^{-6} M Cyanid notwendig (SAUNDERS, HOLMES-STEDLE und STARK 1964). Den Reaktionsansätzen von extrahierter Olea-Droge, gereinigtem Olea-Extrakt und Methylamin wurde Kaliumcyanid in steigenden Konzentrationen zugesetzt (100, 200, 300 und 400 µl einer 0.5 M-KCN-Lösung). Als Vergleiche dienten ein Ansatz ohne extrahierte Droge (Blindversuch) und ein Ansatz ohne KCN-Zusatz (Vergleich).

Im Verhältnis zum Normalansatz kann schon ab Zusatz von 100 µl KCN-Lösung eine Verringerung der Bildung des Methyl-Elenolactams festgestellt werden. Bei Zugabe von 300 und 400 µl findet die Bildung von Methyl-Elenolactam nicht statt. Dies entspricht einer Konzentration von 1.5×10^{-5} Mol KCN im An-

satz. Statt dessen wird im oberen Rf-Bereich ein anderes Dragendorff-positives Produkt detektiert, das in dem Umfang entsteht, wie die Bildung von Methyl-Elenolactam abnimmt.

Abb. 30: Hemmung der Olea-Oxidase-katalysierten Reaktion von Elenolsäure mit Methylamin; Fließmittel Toluol/Rotisol 75:25, Detektion mit Dragendorff-Reagenz

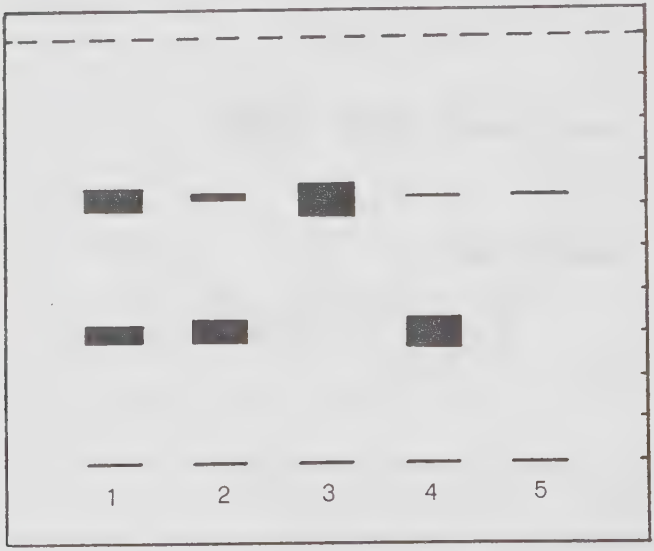


1 Vergleich (Droge ohne KCN-Zusatz)
2 100 µl 0.5 M-KCN-Lösung (3.75×10^{-6} M)
3 200 µl (7.5×10^{-6} M)
4 300 µl (1.5×10^{-5} M)
5 400 µl (3×10^{-5} M)
6 Blindversuch (ohne extrahierte Droge)
Dragendorff-positiv

Um zu klären, ob die Hemmung reversibel ist, wurden parallel die folgenden Reaktionsansätze hergestellt:
1. Die Droge wird in Wasser mit KCN inkubiert, am nächsten Morgen wird Methylamin hinzugefügt und die Reaktion wie üblich durchgeführt;

2. Inkubation der extrahierten Droge wie oben, die Droge wird am nächsten Morgen gewaschen, anschließend erfolgt die Reaktion;
3. KCN-Zusatz frisch während der Reaktion;
4. Normaler Reaktionsansatz (Vergleich);
5. Reaktionsansatz ohne extrahierte Droge (Blindversuch).

Abb. 31: Reversibilität der Hemmung der Olea-Oxidase durch Cyanid; Fließmittel Toluol/Rotisol 75:25, Detektion mit Dragendorff-Reagenz



1 Reaktion nach Inkubation der Droge mit 300 µl 0.5 M-KCN (1.5×10^{-5} M) über Nacht (16 Stunden), KCN nicht ausgewaschen

2 Wie oben, jedoch Droge gewaschen (KCN-frei)

3 Zusatz von KCN-Lösung frisch während der Reaktion

4 Vergleich (Droge ohne KCN-Zusatz)

5 Blindversuch (ohne extrahierte Droge)

Dragendorff-positiv

Um die Ergebnisse zu sichern, wurde noch eine Versuchsanordnung gewählt, in der die Droge von Ansatz 3 des obigen Versuchs nach der Reaktion gewaschen wurde und einem neuen

Reaktionsansatz ohne KCN-Zugabe zugefügt wurde. Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse: Die Hemmung durch Cyanid ist reversibel. Wird die gleiche Droge, die während eines Reaktionsansatzes durch KCN an ihrer Aktion gehindert wird, nach der Reaktion ausgewaschen und einem neuen Reaktionsansatz zugeführt, ist sie wieder voll befähigt, zur Methyl-Elenolactam-Bildung beizutragen. Läßt man Cyanid längere Zeit, beispielsweise über Nacht, auf die Droge einwirken, wird ein Teil der Aktivität des Enzyms wieder freigesetzt, es entsteht wieder Methyl-Elenolactam, wenn auch in geringerem Umfang, neben dem zweiten, neuen Dragendorff-positiven Produkt, das ebenfalls weniger wird. Wird das restliche, über Nacht einwirkende Cyanid ausgewaschen, wird wieder nur Methyl-Elenolactam gebildet. Das neue Dragendorff-Produkt (obere Bande) erwies sich bei näherer Untersuchung (längere Laufstrecke, andere Fließmittel zur besseren Trennung) als Stoffgemisch. Somit kann festgestellt werden, daß, wenn das Enzym nicht agieren kann, der Reaktand möglicherweise auch mit Methylamin oder Cyanid reagiert, daß aber andere Produkte entstehen.

5.2.2 Hemmung durch Natriumfluorid und -azid

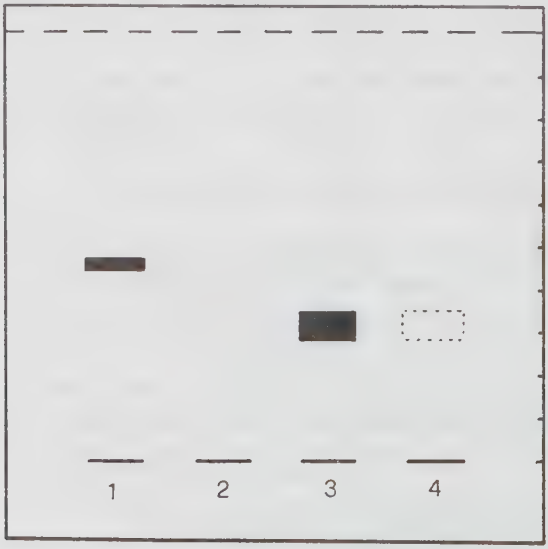
Fluorid und Azid hemmen Meerettich-Peroxidase in Konzentrationen von 10^{-3} M (SAUNDERS, HOLMES-STEDLE und STARK 1964). Weder bei Zusatz von Natriumfluorid noch bei Natriumazid in dieser Konzentration zum Reaktionsansatz, der die zellgebundene Oxidase der Olea-Blätter enthielt, wurde Methyl-Elenolactam gebildet. Auch das neue Reaktionsprodukt, das bei der Hemmung durch Cyanid gefunden wurde, trat nicht auf.

5.2.3 Einfluß von Hydrazin auf die Bildung von Methyl-Elenolactam

Bei FRIDOVICH (1963) ist der Einfluß von Hydrazin auf Meerettich-Peroxidase beschrieben. Hydrazin hemmt pH-Wert-abhängig die Wirkung der Peroxidase. In Gegenwart von 0.02 M Hydrazin /Ansatz über Nacht und anschließende Reaktion mit Methylamin wird die Bildung von Methyl-Elenolactam verhindert. Um eine

Nebenreaktion von Hydrazin mit Elenolsäure auszuschließen, wurde die folgende Versuchsanordnung gewählt: Die extrahierte Droge wird eine Stunde lang mit 0.02 M-Hydrazinhydrochlorid-Lösung in Wasser inkubiert, anschließend die Droge abzentrifugiert und gewaschen; mit der behandelten Droge wurde die Reaktion mit Methylamin durchgeführt. Wie Abbildung 32 zeigt, ist die Wirkung von Hydrazin auf die Olea-Oxidase irreversibel, denn auch mit der gewaschenen Droge wurde Methyl-Elenolactam nicht gebildet. Läßt man Hydrazin während der Reaktion im Ansatz, zeigt sich auf dem DC oberhalb von Methyl-Elenolactam (Vergleich) eine andere, schwach Dragendorff-positive Bande (Untersuchung siehe 2.8).

Abb. 32: DC-Schema der Wirkung von Hydrazin auf die Bildung von Methyl-Elenolactam; Fließmittel Toluol/Rotisol 75:25, Detektion mit Dragendorff-Reagenz



1 Reaktionsansatz mit Hydrazin

2 Reaktionsansatz mit gewaschener (hydrazinfreier Droge

3 Vergleich (Normalansatz)

4 Blindversuch (ohne extrahierte Droge)

Dragendorff-positiv

5.3 Versuche zur Anreicherung der Olea-Oxidase

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die Olea-Oxidase zellwandgebunden ist. Enzyme können ionisch oder kovalent an Zellwandmaterial gebunden sein. Untersuchungen zu Beginn der Arbeit, die zellgebundenen Enzyme durch Behandlung mit Borat-Puffer mit ß-Mercaptoethanol-Zusatz und PVP in Lösung zu bekommen (STÖCKIGT et al. 1979), war kein Erfolg beschieden. Auch Versuche mit Lecithin und Digitonin als Lösungsvermittler (MURPHY und HEOCHA 1972) brachten keinen Fortschritt. Eine Vorschrift für die Extraktion zellwandgebundener Peroxidase findet sich bei GIBSON und LIU (1981). Um die löslichen Enzyme aus dem Pflanzenmaterial zu entfernen, wird dieses in 0.1 M-Natriumsulfat-Lösung pH 5.5 zerkleinert und vom Überstand abzentrifugiert. Dieser Schritt erübrigt sich eigentlich bei dem von Olea zur Verfügung stehenden Drogenmaterial. Aufgrund der ausdauernden Extraktion mit Chloroform-gesättigtem Wasser kann davon ausgegangen werden, daß sich die auf diese Art isolierbaren Enzyme nicht mehr auf der Droge befinden. Zur Ausschaltung möglicher Fehlerquellen wurde jedoch der Extraktionsablauf vollständig nachvollzogen. Der Auszug enthielt aber keine der extrahierten Olea-Droge vergleichbare Wirkung. Um ionisch gebundene Enzyme zu entfernen, wurde der Drogenrückstand bei 5°C zwei Stunden lang mit 200 mM-Calciumchlorid-Lösung inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand sollte die ionisch-zellwandgebundenen Enzyme enthalten. Auch mit einem derartigen Drogenauszug ließ sich Methyl-Elenolactam nicht darstellen.
Die kovalent gebundenen Enzyme können enzymatisch durch Depolymerisierung der Zellwände mit Cellulase und Pectinase freigesetzt werden. Dazu wird der nach obigen Prozeduren verbliebene Drogenrückstand in 0.05 M-Natriumacetat-Puffer pH 5.5 (STAFFORD und BRAVINDER-BREE 1972) in Gegenwart von 2.5 % Pectinase und 0.5 % Cellulase 24 Stunden lang bei 30°C inkubiert. Tatsächlich wurde mit der auf diese Weise erhaltenen Enzymlösung die Bildung von Methyl-Elenolactam erreicht, wenn auch in schwächerem Umfang als mit der bisher verwendeten vorextrahierten Droge. Die Durchführung der Reaktion mit

dem verbleibenden Drogenrückstand ergab, daß sich der größte Teil der enzymatischen Aktivität noch auf der Droge befand. Die anschließenden Untersuchungen sollten klären, welche der Hydrolasen zur Freisetzung der Olea-Oxidase am wirksamsten ist. Der Vergleich ergab, daß sich die Olea-Oxidase besser mit Cellulase freisetzen ließ als mit Pectinase. Die günstigsten Ergebnisse wurden aber mit der Kombination von beiden Enzymen bewirkt. Eine vollständige Freisetzung der enzymatischen Aktivität von der Droge ließ sich jedoch auch nach dreimaliger Inkubation mit dem Enzymgemisch nicht erreichen. Die enzymatische Aktivität der zurückbleibenden Droge war stets größer als die der Enzymlösung. Eine mögliche Eigenaktivität der eingesetzten Cellulase und Pectinase im Sinne einer Oxidase-Aktivität wurde durch Kontrollversuche ausgeschlossen. Daß die Droge auch fermentativ nicht vollständig von der oxidativen Aktivität befreit werden konnte, läßt sich unter Umständen mit dem anatomischen Aufbau der Ölbaumblätter erklären: Es handelt sich um xeromorphe Blätter mit dicken, teilweise sklerosierten Zellwänden (Fasern) (SCHNEIDER und LÖBENBERG 1974). Eine mikroskopische Untersuchung der 24 Stunden lang mit Cellulase und Pectinase inkubierten Blätter ergab, daß sich die Zellwände gegenüber denen von nicht mazerierten Blättern kaum verändert hatten. Selbst eine Inkubationszeit von 60 Stunden veränderte die Konsistenz der Blattmasse kaum. Weitere Versuche, mit verschiedenen Salz- und Puffer-Lösungen die enzymatische Aktivität von der Droge vollständig zu lösen, führten nicht zu nennenswerten Verbesserungen. Aus den Untersuchungsergebnissen kann geschlossen werden, daß es sich bei der Olea-Oxidase um ein zellwandgebundenes Protoporphyrin-Enzym (Redoxase) handelt. Es spricht vieles dafür, daß die Olea-Oxidase ein Enzymgemisch mit unterschiedlicher Bindungsfestigkeit an unlöslichen Biopolymeren ist.

Eine gängige Methode, zellwandgebundene Enzyme auch ohne Isolierung einsetzen zu können, besteht in der Reinigung des Enzymträgers mit Aceton. Dazu wurde die Droge feinst pulverisiert und mit eiskaltem Aceton am Ultraturrax extrahiert. Die resultierende Aufschlämmung wurde filtriert und mit eiskaltem

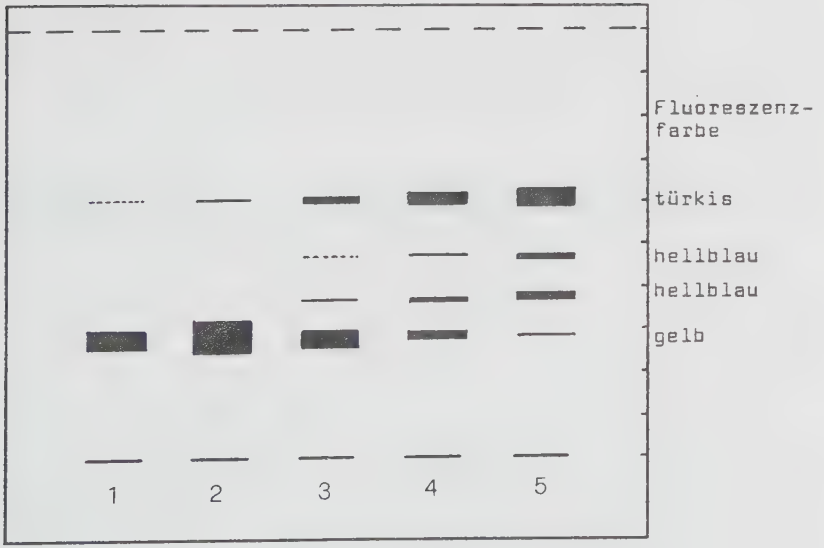
Aceton bis zur Farblosigkeit der Waschflüssigkeit gewaschen. Der Rückstand wurde zwischen Filtrierpapier ausgebreitet und bei Raumtemperatur getrocknet. Das Ergebnis ist ein feines hellgraues Pulver, das seine enzymatische Aktivität im Vergleich zur bisher verwendeten extrahierten Droge voll behalten hat. In den folgenden Versuchen wurde das mit Aceton behandelte Drogenpulver anstelle der mit Wasser extrahierten Droge eingesetzt.

6. UNTERSUCHUNGEN ZUR KINETIK DER ELENOLACTAM-BILDUNG AUS ELENOLSÄURE UND METHYLAMIN

Das Verhältnis von umgesetzter Elenolsäure aus Olea-Extrakt zu gebildetem Reaktionsprodukt wurde untersucht: Ein normaler Reaktionsansatz wurde nach zwei Stunden vom Enzymträger abzentrifugiert, mit 0.1 N-HCl auf pH 2 eingestellt und mit Diethylether ausgeschüttelt. Die Etherphase enthält den etwaigen Anteil nicht umgesetzter Elenolsäure. Aus der Wasserphase wurde Methyl-Elenolactam wie sonst üblich mit Chloroform ausgeschüttelt. Als Vergleiche dienten eine entsprechende Menge gereinigten Olea-Extrakts, mit Salzsäure auf pH 2 eingestellt und mit Ether ausgeschüttelt sowie ein Standardansatz. Von allen Ansätzen wurden DC in verschiedenen Fließmitteln angefertigt und mit 2.4-DNPH-Reagenz bzw. Dragendorff-Reagenz detektiert. In der Etherphase konnte nach der Reaktion noch wenig Reaktand detektiert werden. Bei erneutem Zusatz von Methylamin zum Reaktionsansatz müßte nach dem Entfernen des gebildeten Methyl-Elenolactams also neues Reaktionsprodukt gebildet werden. Dies bestätigte sich bei den folgenden Versuchen, die zeigen sollten, inwieweit sich die Ausbeute an Methyl-Elenolactam durch Änderung des Gleichgewichts der Reaktanden beeinflussen läßt. Wie gezeigt wurde (2.2), kann durch eine Erhöhung der Methylaminmenge von vornherein nicht die Bildung von mehr Reaktionsprodukt erreicht werden. Es scheint sich ein Gleichgewicht zwischen den Reaktanden und dem Reaktionsprodukt eingestellt zu haben, daß nach dem Ausschütteln von Methyl-Elenolactam aus dem Ansatz gestört wird und auch ohne Zugabe von Methylamin zur Neubildung von Methyl-Elenolactam führt. Die Ausbeute läßt sich durch Zugabe von Methylamin noch weiter steigern: Nach einer Stunde Reaktionszeit wurde zentrifugiert und ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wurde mit frischem Enzymträger und weiteren 50 µl Methylamin versetzt und die Prozedur noch zweimal wiederholt. Beim ersten und zweiten Mal wurde noch neues Methyl-Elenolactam gebildet, nach der zweiten Zugabe allerdings nur sehr wenig und beim dritten Mal keines mehr. Abschließend wurde geklärt, ob sich die Reaktionszeit generell noch ver-

kürzen ließ, deren Dauer von zwei Stunden noch auf den Ergebnissen der mit Wasser vorextrahierten Droge als Enzymträger beruhte, wobei eine weitere Verkürzung der Reaktionszeit nicht zur Erhöhung der Menge an Reaktionsprodukt führte. Die Untersuchungen mit dem Aceton-gereinigten Drogenpulver ergaben, daß die Ausbeute an Methyl-Elenolactam nach einer Stunde Reaktionszeit wesentlich höher war als nach zwei Stunden. Außer Methyl-Elenolactam wurde im oberen Rf-Bereich eine bisher nur schwach detektierbare Dragendorff-positive Zone deutlich sichtbar. Diese Bande zeigt im langwelligen UV-Licht eine türkise Fluoreszenz. Die Reaktionszeit wurde nun stufenweise bis auf 7.5 Minuten (1/8) verkürzt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 33.

Abb. 33: Bildung von Dragendorff-positiven Produkten aus Elenolsäure (aus Calcium-Elenolat) und Methylamin bei verschiedenen Reaktionszeiten; Fließmittel Toluol/Rotisol 75:25, Detektion im UV-Licht bei 365 nm und mit Dragendorff-Reagenz



1 2 Stunden Reaktionszeit
2 1 Stunde
3 1/2 Stunde
4 1/4 Stunde
5 1/8 Stunde
Dragendorff-positiv

Es ist deutlich zu erkennen, daß nach 1/8 Stunde kaum Methyl-Elenolactam gebildet wurde, dafür aber viel von dem oberen Reaktionsprodukt. In dem Maß, wie das obere Reaktionsprodukt abnimmt, nimmt die Menge an Methyl-Elenolactam bis zu einer Reaktionsdauer von 1 Stunde zu. Darüberhinaus sind zwischen den beiden Produkten noch zwei schwache Dragendorff-positive Banden zu erkennen, deren Menge sich ebenfalls zeitabhängig verändert.

7. ANHANG: NACHWEIS VON ELENOLSÄURE IN LIGUSTRUM VULGARE L.

Bisher wurde Elenolsäure nur in Olea europaea L. nachgewiesen. Während der Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der quantitativen Bestimmung von Elenolsäure-Komplex gelangten auch Ligusterblätter zur Untersuchung. Liguster-Blattextrakte wurden wie die Olea-Extrakte auf zwei verschiedene Arten hergestellt: Einmal wurde die Droge nur durch Kochen mit Wasser extrahiert, zum anderen durch Kochen mit Puffer pH 1. Während mit dem mit Wasser extrahierten Liguster-Extrakt keine Reaktion mit p-NPH stattfand, wurde mit dem mit Puffer erhaltenen Extrakt das gleiche Reaktionsprodukt erhalten wie bei der Reaktion von Olea-Extrakt mit p-NPH. Bei 400 nm betrug die Extinktion über 1. Ein ebenfalls durch saure Extraktion hergestellter gereinigter Liguster-Extrakt wurde daraufhin auch der Reaktion mit Methylamin unterworfen. Es wurde ein DC mit dem Methyl-Elenolactam identisches Reaktionsprodukt erhalten. Nachstehend die UV-Absorptionsspektren von Olea- und Liguster-Extrakten mit p-NPH und mit Methylamin:

Abb. 34: Reaktionsprodukte mit p-NPH von Olea- —— und Liguster-Extrakten --- in 1 N-HCl

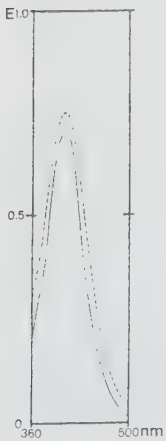
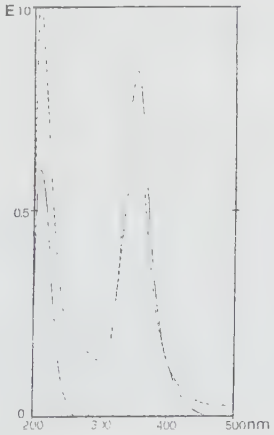


Abb. 35: Methyl-Elenolactam —— und Reaktionsprodukt aus Liguster-Extrakt mit Methylamin --- in Ethanol abs.



8. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Wirkung der Olea-Blätter

Wie in der Einleitung bereits dargelegt wurde, senken Ölbaumblätter sowie deren wäßrige oder alkoholische Auszüge den pathologisch erhöhten Blutdruck. Auf der Suche nach dem Wirkungsprinzip konnten PETKOV und MANOLOV 1972 in Tierexperimenten beweisen, daß Oleuropein bei parenteraler Gabe eine reproduzierbare hypotensive Wirkung auf experimentell erzeugten Hochdruck ausübte. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, w i e die Wirkung zustande kam.
Die Untersuchungen galten darum zunächst Oleuropein.

Isolierung von Oleuropein

"Wieviel Mühe Reinisolation und Strukturaufklärung der Naturstoffe, die wir heute als iridoide Verbindungen bezeichnen, bereitet haben, wird ganz einfach durch die Tatsache illustriert, daß in Walter Karrers Handbuch (1958) nur Loganin, Gentiopikrin, Nepetalacton, Fulvoplumierin, Verbenalin (Cornin), Asperulosid und Aucubin aufgeführt werden, und daß von den wiedergegebenen Strukturformeln sich später nur diejenigen von Nepetalacton und Fulvoplumierin als richtig erwiesen." So HEGNAUER und KOOIMAN 1978 in einer Veröffentlichung zu Iridoiden. Die Iridoidglykoside sind im allgemeinen sehr labile Verbindungen (BOBBITT und SEGEBARTH 1969). Nach Einwirkung von pflanzeneigenen Säuren und β-Glukosidasen liefern sie häufig nicht faßbare Aglyka, die zu schwarzen Massen polymerisieren. Hierin liegt wahrscheinlich auch die Problematik der DAC-Isolierung. Einige der Esteriridoide, zu denen auch Oleuropein gehört, sind darüberhinaus sehr alkaliempfindlich. Die meisten Iridoidglykoside sind schwer auszuschütteln oder zu fällen. Das Iridoidgerüst besitzt keine zur Komplexbildung geeignete Gruppierung im Molekül. Während die Abtrennung lipophiler Begleitstoffe wie Chlorophyll und Fette kein Problem darstellt, wird die Reinigung der häufig nicht kristallisierbaren Glykoside stark erschwert durch die

in die wäßrige Fraktion mit übergehenden phenolischen Begleitstoffe wie Flavonoide und Gerbstoffe sowie Mono- und Oligosaccharide. Eine gute Übersicht zu den gebräuchlichen Isolierungsmethoden gaben 1975 STICHER und JUNOD-BUSCH. Für Oleuropein lagen bis zu diesem Zeitpunkt vergleichsweise unbefriedigende Isolierungsmethoden vor: Nach DAC wird ein stark konzentrierter, wäßriger Auszug aus Ölbaumblättern ausgesalzen, getrocknet, mit Aceton erschöpfend ausgezogen und wieder getrocknet. Diese Methode liefert ein stark verunreinigtes Oleuropein-Rohglykosid. Eine neuere Isolierungsmethode, die zur quantitativen Bestimmung entwickelt wurde, brachte keine entscheidende Verbesserung (HUBER 1975): Die mit Petrolether vorgereinigte Droge wird mit Ethanol extrahiert, der getrocknete Extrakt mit Wasser digeriert und das Filtrat mit großen Mengen heißen Ethylacetats ausgeschüttelt. Diese Methode bringt sehr geringe Ausbeuten; in gelagerter Droge konnte fast kein Oleuropein mehr nachgewiesen werden. Eine andere Isolierungsmethode, die höhere Ausbeuten an reinerem Oleuropein lieferte, war daher wünschenswert. Eine solche Isolierungsmethode wurde in den Voruntersuchungen zu dieser Arbeit erstellt. Nach unseren Untersuchungen ist Oleuropein in isolierter, reiner Form ein labile Verbindung, die nur kurze Zeit als intaktes Glykosid vorliegt.

Reaktion der Ölbaumblätter mit Aminen

Daß die Inkubation von Ölbaumblättern mit Aminen in schwach saurem Medium zu definierten Reaktionsprodukten führte, gab einen Hinweis auf einen möglichen Reaktionsmechanismus: Die Fähigkeit zur Reaktion mit biogenen Aminen, beispielsweise den Catecholaminen und Serotonin. Oleuropein könnte somit in den Haushalt biogener Amine im Organismus eingreifen und über diesen Weg den Blutdruck beeinflussen. Oleuropein bietet aber gegenüber Aminen praktisch keine Angriffsmöglichkeit, solange das Glykosid intakt ist. Glykoside werden im Blut nicht hydrolysiert, auch erfolgt die Metabolisierung üblicherweise nicht durch Glykosidspaltung (PETERS 1980, KUHLMANN 1981). Eine Wirkung von Oleuropein im genannten Sinn bei parentera-

ler Gabe scheint deshalb ausgeschlossen zu sein. Außerdem wurde festgestellt, daß auch oleuropeinfreie Extrakte mit Aminen reagierten. Die Suche nach dem Reaktanden zur Bildung Dragendorff-positiver Reaktionsprodukte führte zur Elenolsäure.

Gewinnung von Elenolsäure

Wie während der Untersuchungen gezeigt werden konnte, entsteht Elenolsäure durch H^+- oder Enzym-katalysierte Hydrolyse von Oleuropein. In gelagerter Droge sind bereits geringe Mengen an Elenolsäure vorhanden. Es ist anzunehmen, daß die Freisetzung durch pflanzeneigene Glukosidasen und Esterasen bewirkt wird. Bei der Inkubation selbst gepflückter Droge mit Methylamin wenige Stunden nach der Ernte konnte durch die Bildung von Methyl-Elenolactam Elenolsäure nachgewiesen werden. Wahrscheinlich setzt der Oleuropein-Abbau in den Blättern der immergrünen Pflanze schon auf dem Baum ein. Eine Ausbeute-Steigerung kann durch Hydrolyse des Oleuropeins durch Kochen bei niedrigem pH-Wert erreicht werden. Um quantitative Aussagen machen zu können, wurde eine Bestimmungsmethode, die auf der Reaktion der Aldehyd-Funktionen mit Hydrazin-Derivaten beruht, entwickelt. Diese scheint quantitativ abzulaufen, außerdem stimmt sie recht gut mit dem durch Wägen bestimmten Gehalt überein. Elenolsäure erwies sich während der Versuche als nur relativ säurestabil; von Kochzeiten, die über eine Stunde hinausgehen, ist abzuraten. Offensichtlich wird das Molekül weiter abgebaut. Eine gute Quelle zur Gewinnung von Elenolsäure ist der heimische Ligustrum vulgare L., aus dem unseren Untersuchungen zufolge höhere Ausbeuten als aus Olea europaea L. zu erwarten sind. Auch in Ligustrum ist Elenolsäure nicht genuin vorhanden. Sie entsteht mit großer Wahrscheinlichkeit aus Ligstrosid, das sich von Oleuropein nur durch das Fehlen einer phenolischen OH-Gruppe unterscheidet (EL-NAGGAR und BEAL), siehe Abbildung 36.

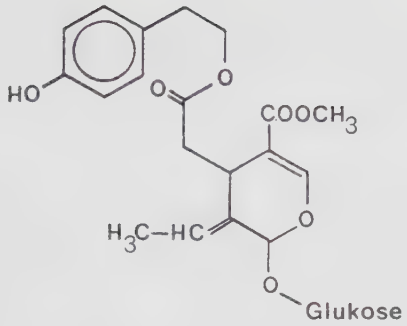


Abb. 36: Ligstrosid

Zur Chemie der Elenolsäure

Seit den Untersuchungen von VEER (1959, 1962) hätte man das Wirkungsprinzip der Ölbaumblätter als geklärt betrachten können, wenn die Elenolsäure (von "eleia", dem griechischen Namen des Ölbaums) ein genuin in der Droge vorhandener Stoff wäre. Er stellte fest, daß alle Ester und Salze der Elenolsäure sowohl parenteral als auch oral als blutdrucksenkende Substanzen eingesetzt werden können. Zunächst sollen die bisher zur Elenolsäure gewonnenen Erkenntnisse zusammengefaßt werden, da sie für die Auswertung der vorliegenden Ergebnisse und die Beurteilung der physiologischen Wirkung grundlegend sind. Bei Durchsicht der Literatur ergab sich, daß Unklarheiten in der Benennung von Elenolsäure (elenolic acid) und Elenolid bestehen. Häufig werden beide Namen synonym gebraucht. Dies entspricht jedoch nicht den Tatsachen: Elenolid entsteht durch Wasserentzug aus Elenolsäure und ist deren Lacton.
1957 fanden VEER und Mitarbeiter bei der Fraktionierung von Extrakten aus Blättern, Früchten und Rinde des Ölbaums eine neue Substanz, die durch Hochvakuumdestillation der sauren Komponenten gewonnen wurde. Die Verbindung mit der Summenformel $C_{11}H_{12}O_{15}$ wurde als ungesättigtes Lacton erkannt und Elenolid genannt. Elenolid hydrolysierte mit Wasser zu einer Monocarbonsäure von öliger Konsistenz mit der Summenformel

$C_{11}H_{14}O_{16}$, die mit Calcium ein kristallines Salz bildete. 1958 beschäftigte sich eine italienische Arbeitsgruppe um PANIZZI mit der Konstitution von Oleuropein und stellte fest: Oleuropein läßt sich durch saure Hydrolyse in drei Komponenten spalten

1. Glukose,
2. 2-(3.4-Dihydroxy-phenyl)-ethanol
3. einen öligen Methylester $C_{11}H_{14}O_{16}$, der ohne Zersetzung nicht destillierbar ist.

Die zuletzt genannte Substanz wird folgendermaßen charakterisiert: Die ölige Verbindung enthält eine schon im Oleuropein nachgewiesene Methoxygruppe, die im alkalischen als Methanol eliminiert werden kann und vermutlich eine $-COOCH_3$-Gruppe darstellt. Außerdem ist eine Carbonylfunktion vorhanden, die durch Bildung eines nichtkristallinen Dinitrophenylhydrazons nachgewiesen wird. Mit Phenylhydrazin entsteht ein kristallines Derivat. Mit Diazomethan entsteht ein Dimethylester, der aufgrund seiner Reaktionen eine enolisierbare Aldehydgruppe enthält. Diese wird schon bei Oleuropein nach alkalischer Hydrolyse und Glukoseabspaltung vermutet. Die Substanz liefert ein Lacton mit der Summenformel $C_{11}H_{12}O_{15}$ und wird als identisch mit dem Elenolid von VEER et al. erkannt. Wahrscheinlich ist die Säure des Lactons ebenfalls identisch mit einem bereits 1934 von CRUESS und ALSBERG beschriebenen bitteren Ester, der bei der Untersuchung des Bitterstoffes der Oliven gefunden wurde. Eine weitere Veröffentlichung der Gruppe um PANIZZI bestätigt und erweitert 1960 die bisherigen Ergebnisse; demnach enthält Elenolsäure folgende Teilstrukturen:

- Eine freie Carboxylgruppe,
- eine Ethylidengruppierung,
- eine Methylestergruppe und
- eine enolisierbare Aldehydgruppe am gleichen C-Atom.

Die übrige O-Funktion stellt einen Enolether dar. Vorgeschlagen wird die Struktur Abbildung 37. Für das von der holländischen Arbeitsgruppe entdeckte Lacton wird "unter vorsichtiger Zurückhaltung" die Struktur Abbildung 38 vorgeschlagen. Zur gleichen Zeit (1959 - 1961) untersucht auch eine israeli-

sche Arbeitsgruppe, SHASHA und LEIBOWITZ, die Struktur von Oleuropein. Dabei kommen sie zu abweichenden Ergebnissen.

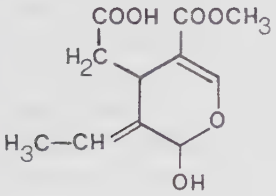


Abb. 37: Elenolsäure

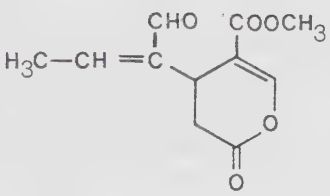


Abb. 38: Elenolid

Zwar soll auch hier Oleuropein durch saure Hydrolyse in drei Komponenten gespalten werden, doch soll es sich um einen Diester von Glukose handeln. Die nichtglykosidischen Anteile werden als eine phenolische Säure und eine ungesättigte nichtaromatische Säure bezeichnet. Dies beinhaltet zum Teil richtige Schlüsse, nämlich die o-Diphenolstruktur des 3.4-Dihydroxyphenylethanolanteils, sowie den ungesättigten, nichtaromatischen Charakter der Elenolsäure, die als Monoterpen erkannt wird und als Oleuropeinsäure bezeichnet wird. Diese Oleuropeinsäure wollen auch 1962 MECHOULAM et al. isoliert haben. Sie ist nicht identisch mit der 1966 von SCARPATI und TROGOLO isolierten Oleuropeinsäure, die ein Bestandteil der 6-O-Oleuropeoylsucrose ist.

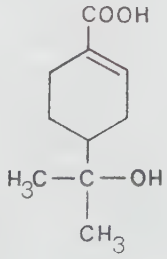


Abb. 39: Oleuropeinsäure

PANIZZI et al. können 1965 in einer weiteren Veröffentlichung

beweisen, daß ihre Strukturaufklärung zutrifft. Zusätzlich wurden bereits 1961 PANIZZIs Ergebnisse von BEYERMAN et al. durch weitere Untersuchungen bestätigt; obwohl die Argumente anderer Natur sind - vor allem spektroskopische Methoden wurden angewandt - führten sie zu den gleichen Ergebnissen. Weder Elenolsäure noch Elenolid konnten bisher rein gewonnen werden. Elenolid bildet zwar Kristalle, jedoch besteht eine Diskrepanz zwischen errechnetem und gefundenem Molekulargewicht von 224 bzw. 282 (VEER et al. 1957, BEYERMAN et al. 1961). Elenolsäure selbst wurde erst in ihren Estern und Salzen rein erhalten (VEER 1959, 1962, FORD et al. 1972), in freier Form liegt sie nicht einheitlich vor. Unsere DC-Untersuchung des als rein bezeichneten authentischen Calcium-Elenolats erwies sich auch als nicht einheitlich; vielmehr handelt es sich um eine Schar chromatographisch bisher nicht getrennter Tautomere. Eine Übersicht der möglichen tautomeren Formen der Elenolsäure gibt Abbildung 40. Sie verdeutlicht, warum es schwierig ist, ein einheitliches Hydrazon der Substanz zu erhalten. Form I stellt das Enolhalbacetal, die "normale Form" der Iridoide dar, III und II den Dialdehyd bzw. dessen Enol nach Ringöffnung dar. Über diese Formen wird die Dihydropyran-Form IV gebildet.

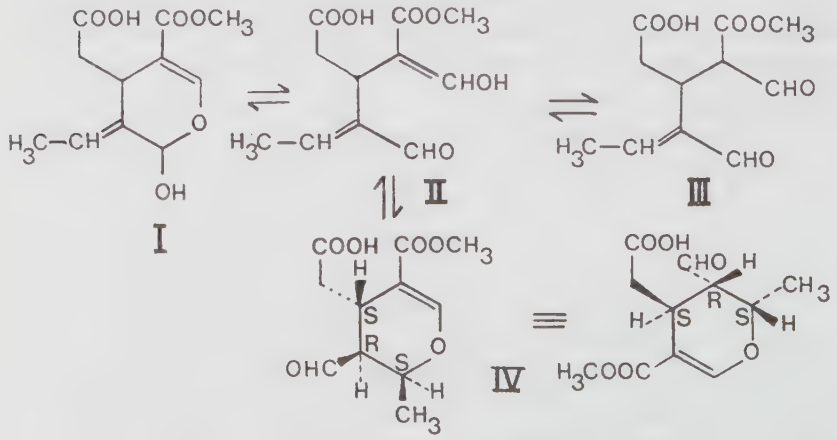


Abb. 40: Mögliche tautomere Formen und absolute Konfiguration der Elenolsäure (FORD et al. 1972, KELLY et al. 1973)

1973 wurde der Methylester der Elenolsäure durch Totalsynthese dargestellt. Es zeigte sich, daß der Methylester und das Calcium-Elenolat der Form IV entsprechen.(KELLY und SCHLETTER).

Reaktion mit Aminen

Bei der Reaktion von Elenolsäure-Methylester mit Tryptamin (MACKELLAR et al. 1973) entsteht als intermediäres Produkt unter Freisetzung von Methanol zunächst ein Imin. Dieses zyklisiert anschließend zum stabilen Lactam:

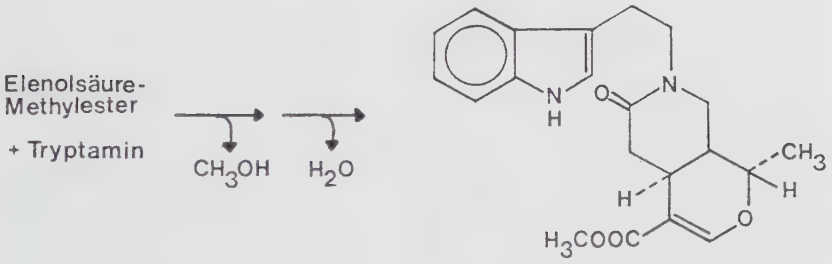


Abb. 41: Lactam aus Elenolsäure-Methylester und Tryptamin

Nach Darstellung des quaternären Amins durch weitere Zyklisierung und anschließende Reduktion mit Natriumborhydrid konnte schließlich (-)-Ajmalicin gewonnen werden. Bis zur Zyklisierung zum Lactam ist der Reaktionsmechanismus zur Bildung von Methyl-Elenolactam analog dem Mechanismus zur Bildung des oben genannten Lactams nachvollziehbar. Die zweite Doppelbindung des Methyl-Elenolactams zwischen den C-Atomen 5 und 6 wird nach unseren Untersuchungen durch die enzymatische Aktivität der zellgebundenen Olea-Oxidase bewirkt. Dabei konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden: Methyl-Elenolactam entsteht nur, wenn dem Reaktionsansatz von Olea-Extrakt mit Methylamin die mit Wasser extrahierte Leerdroge zugesetzt wird. Bei der Reaktion des Olea-Extrakts mit Methylamin ohne Zusatz von Leerdroge

entsteht nach einstündiger Reaktionszeit zwar auch Methyl-Elenolactam, aber so wenig, daß es nur im langwelligen UV-Licht als schwache gelbliche Fluoreszenz zu erkennen ist. Eine sichtbare Reaktion mit Dragendorff-Reagenz findet nicht statt. Die Bildung von Methyl-Elenolactam konnte auch durch Zusatz von Oxidationsmitteln wie Hexacyanoferrat(III), eine Redoxase wie Meerettich-Peroxidase oder Elektronen-Acceptoren wie NAD^+ und $NADP^+$ erreicht werden. Die Pyridin-Nucleotide besitzen selber keine oxidierenden Eigenschaften, sondern fungieren bei der enzymatischen Dehydrogenierung nur als Elektronenacceptoren. Sie wirken als Teil eines Systems, das außerdem noch eine Dehydrogenase enthalten muß. Möglicherweise befindet sich im Olea-Extrakt eine derartige Dehydrogenase. Diese Annahme wird dadurch erhärtet, daß bei der Reaktion von isolierter Elenolsäure mit Methylamin bei Zusatz von NAD^+ oder $NADP^+$ ohne Zusatz von Leerdroge mit Dragendorff-Reagenz Methyl-Elenolactam nicht detektiert werden kann.

Zur Enzymatik der Alkaloid-Bildung in der Pflanze ist bis auf wenige Ausnahmen - z.B. Aktion einer Synthase bei der Biogenese von Strictosidin (STÖCKIGT et al. 1979) - wenig bekannt. Möglicherweise sind dies relativ unspezifische Aktionen wie in diesem Fall die Wirkung einer Oxidase, die ohne weiteres auch durch die nicht aus der gleichen Pflanze stammende Peroxidase und sogar durch anorganische Oxidantien ersetzt werden kann.

Die Frage stellt sich, warum scheinbar das nicht dehydrierte Produkt mit einer Doppelbindung nicht in Erscheinung trat. Wir vermuten, daß es sich bei dem zweiten Dragendorff-positiven Produkt, das bei der Hemmung der Peroxidase durch Cyanid auftrat, um diese Reaktionsstufe handelt. Untermauert wird diese Hypothese durch die Untersuchungen zur Kinetik der Reaktion. Bereits nach einer Reaktionszeit von 7.5 Minuten trat nämlich das Dragendorff-positive Produkt im oberen Rf-Bereich auf, das bei längerer Reaktionszeit zugunsten von Methyl-Elenolactam verschwand. Die Isolierung auch dieses Produktes bietet sich für weitere Untersuchungen ebenso an, wie die des reduzierten Methyl-Elenolactams. Dabei ist fraglich, ob analoge Produkte gebildet werden, wie bei der Reaktion des Tryp-

tamin-Derivates mit Elenolsäure, die bei MACKELLAR et al. beschrieben wurden. Es könnten auch Produkte entstehen, wie sie bei BIANCO et al. 1979 beschrieben wurden. In diesem Fall wurde zunächst der Pyranring reduziert (Abbildung 42).

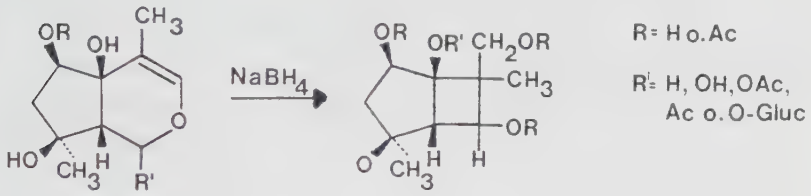


Abb. 42: Reduktion von Iridoid-Aglyka (BIANCO et al. 1979)

Während der Untersuchungen zur Freisetzung von Elenolsäure aus Oleuropein wurden nach Einwirkung von Säure bei 37°C und anschließender Reaktion mit Methylamin weitere Dragendorff-positive Produkte gefunden, die weder dem Methyl-Elenolactam noch dem oben genannten Produkt entsprechen. Um eine Reaktion von Oleuropein mit Aminen zu ermöglichen, genügt die Entstehung des Oleuropein-Aglukons. Bei entsprechender Versuchsanordnung müßten auch diese Produkte faßbar werden (Abbildung 43).

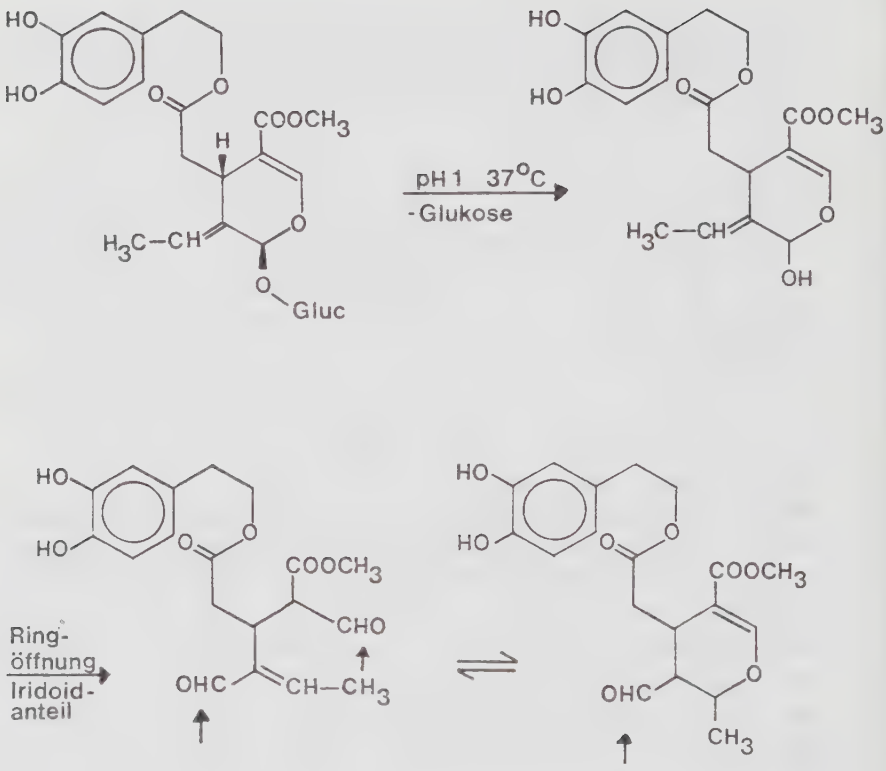


Abb. 43: H^+-katalysierte Hydrolyse und Umlagerung von Oleuropein bei 37°C

Schlußfolgerungen

Die Reaktionsfähigkeit der Elenolsäure mit Aminogruppen scheint ein Grund ihrer pharmakologischen Wirkungen zu sein. Ähnliche Reaktionen zu Kondensationsprodukten biogener Amine mit verschiedenen Aldehydkomponenten sind in der Literatur häufiger beschrieben. So gelang es 1976 REPETTO und MARTINEZ, Kondensationsprodukte von Serotonin und Acetaldehyd darzustellen. SOLIMAN und Mitarbeiter beschrieben 1978 die Kondensation von (-)-Ephedrin mit Benzaldehyd und PINDUR berichtet von der Bildung von Tetrahydro-ß-carbolinen bei der Reak-

tion von Tryptophan mit Dimethylaminobenzaldehyd in Eisen-(III)-chlorid-haltigem saurem Medium. In-vitro-Untersuchungen sind jedoch häufig in der klinischen Anwendung nicht nachvollziehbar. Umfangreiche pharmakologische Untersuchungen mit Calcium-Elenolat bezeigen aber neben der blutdrucksenkenden Wirkung eine unspezifische Aktivität gegen Viren (SORET, RENIS, ELLIOTT et al. 1969, HIRSCHMAN 1972, RENIS, HEINZE et al. 1975). Die empirische Anwendung der Blattdroge erfährt so möglicherweise eine Bestätigung. Natürlich können auch andere Inhaltsstoffe der Droge, z.B. Phenole (Flavonoide) an der Wirkung beteiligt sein.

Die Wirkung von Oleuropein ließe sich auch erklären: Nach den vorliegenden Untersuchungen wirkt Oleuropein nicht als intaktes Glykosid, sondern nach hydrolytischer Spaltung als Elenolsäure. Bei oraler Anwendung wäre dies verständlich, da bei dem niedrigen pH-Wert des Magensaftes und gleichzeitiger Anwesenheit von Enzymen eine Spaltung des Glykosids erfolgt. Auch HUBER konnte nachweisen, daß nach drei Stunden bei pH 1.1 kein intaktes Oleuropein mehr gefunden wurde. Durch Reaktion mit Catecholaminen nach Resorption könnten Verbindungen entstehen, die strukturell dem Reserpin sehr ähnlich sind (WOODWARD et al.1957). Die pharmakologiscne Prüfung von Methyl-Elenolactam auf eine derartige Wirkung könnte hier Klarheit schaffen. Nicht geklärt wird scheinbar die Wirkung von Oleuropein bei parenteraler Anwendung. Entweder sind noch andere Mechanismen an der Wirkung beteiligt, oder folgende Erklärung trifft zu: Wie bereits erwähnt, liegt Oleuropein in isolierter, reiner Form nur kurze Zeit als intaktes Molekül vor. So kann auch angenommen werden, daß in der injizierten Lösung bereits Abbauprodukte des Glykosids zur Anwendung kamen.

Aus der Tatsache, daß Elenolsäure zur Bildung monoterpenoider Indolalkaloide herangezogen werden kann, ergibt sich für die Biosynthese der Cinchona-Alkaloide und der Indolalkaloide der Apocynaceae eine interessante Alternative: Elenolsäure könnte wie das Secoiridoidglykosid Secologanin ein monoterpenoider Baustein für die genannten Alkaloide sein (BATTERSBY et al. 1968, BROWN und CHAPPLE 1976, BROWN und LEONARD 1978, TIETZE

1983). Für Olea europaea L. ist dies sogar sehr naheliegend; die Droge enthält Chinaalkaloide - aber Secologanin als deren Vorstufe konnte in der Pflanze nicht aufgefunden werden. Beide Verbindungen sind sehr nahe miteinander verwandt: Reduziert man die Carboxylgruppe des Glykosids der Elenolsäure, Oleosid (INOUYE 1978) zum Aldehyd, so erhält man Secologanin.

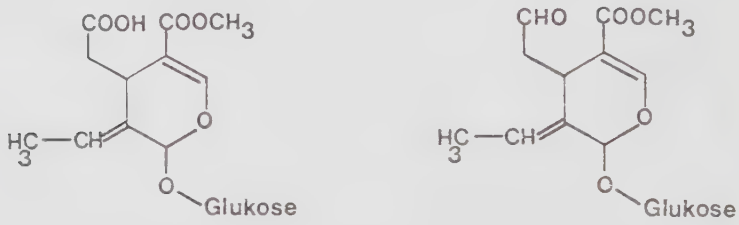


Abb. 44: Oleosid und Secologanin

Aus der Bildung der Elenolactame aus der Form IV der Elenolsäure ergibt sich auch für Elenolid eine mögliche strukturelle Alternative. Anstelle der von BEYERMAN et al. vorgeschlagenen Struktur A, die aus der Form I über II/III und V entsteht, müßte auch die Bildung von B aus der Form IV über die Form VI möglich sein (Abbildung 45).

An Methyl-Elenolactam selbst (und an den Elenolactamen homologer Amine) sind die folgenden Eigenschaften bemerkenswert:

- Die intensive Gelbfärbung deutet eigentlich auf das Vorliegen einer quartären Ammoniumverbindung hin;
- das Verhalten bezüglich der Ausschüttelbarkeit mit organischen Lösungsmitteln - gute Löslichkeit in Chloroform und Dichlormethan, schlechte bis praktisch keine in Diethylether;
- das Fließverhalten bei unterschiedlichen pH-Werten auf dem DC - durch saure oder basische Atmosphäre wird der Rf-Wert nur sehr wenig beeinflußt.

Im Sauren scheint keine Ringöffnung des Lactams stattzufinden. Hier liegt eine Analogie zu Coffein (und anderen Harnsäurederivaten) vor, das eine gleiche Teilstruktur hat (Ab-

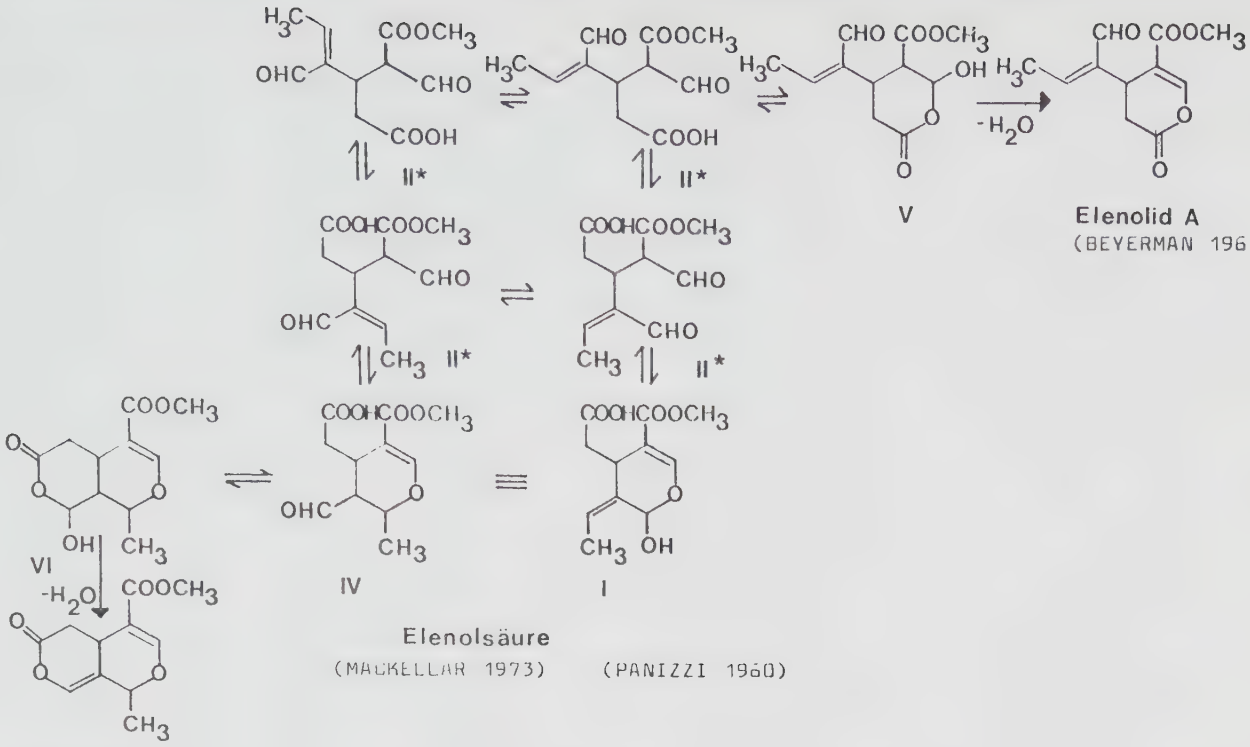


Abb. 45: Mögliche Wege zur Entstehung von Elenolid aus Elenolsäure; * von Form II können auch die tautomeren Enole auftreten = III. Die dargestellte z-Konfiguration an der C-C-Doppelbindung ist nicht gesichert.

bildung 46).

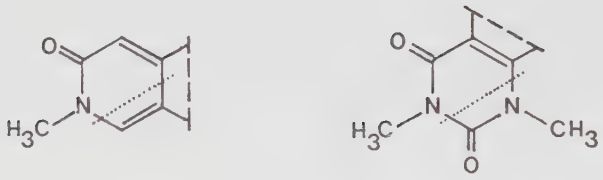


Abb. 46: Teilstrukturen von Methyl-Elenolactam und Coffein

Nach Behandlung mit Mineralsäuren reagiert auch Coffein mit Dragendorff-Reagenz, es bildet sich ein Tetraiodobismutat; mit Jod entsteht ein schwerlösliches Periodid. Andererseits reagiert Methyl-Elenolactam ohne vorherige Protonierung mit Dragendorff-Reagenz; wäre nicht die nachstehende Formel am ehesten vorstellbar?

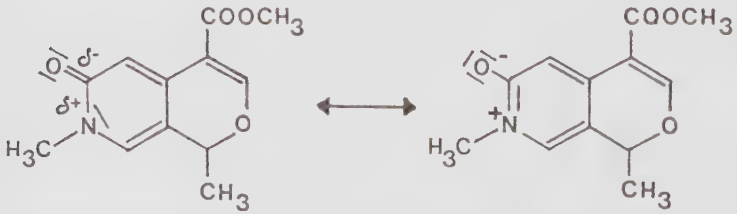


Abb. 47: Methyl-Elenolactam als quartäre Ammoniumverbindung

9. ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei der Inkubation von Blättern von Olea europaea L. mit primären Aminen wurde dc die Entstehung Dragendorff-positiver Substanzen beobachtet. Die Bedingungen zur Entstehung dieser Substanzen sowie deren Isolierung wurde untersucht. Dazu wurde ein standardisiertes Verfahren zur Extraktbereitung und Drogenverarbeitung sowie zur Durchführung der Reaktion erstellt.

2. Die Reaktionsprodukte mit der Arbeitsbezeichnung Oleamine wurden durch Reaktion des Extrakts mit Aminen in essigsaurem Medium bei gleichzeitiger Anwesenheit des extrahierten Blattmaterials erhalten. Sie lassen sich mit Chloroform und Dichlormethan, nicht aber mit Diethylether aus dem Reaktionsansatz ausschütteln. Darüberhinaus zeigen sie ein von echten Alkaloiden abweichendes Fließverhalten bei unterschiedlichen pH-Werten der Kammeratmosphäre.

3. Das Reaktionsprodukt mit Methylamin wurde näher untersucht. Die Verbindung wurde isoliert und mit Hilfe von spektroskopischen Methoden (UV-, IR-, ^{1}H-NMR- und Massenspektroskopie) charakterisiert. Es handelt sich um (1S)--6.7-Dihydro-1.7-dimethyl-6-oxo-1H-pyrano[3.4-c]pyridin-4-carbonsäuremethylester. Es wird vorgeschlagen, das Produkt als Methyl-Elenolactam zu bezeichnen und als übergeordnete Bezeichnung für die Stoffe von Elenolactamen zu sprechen. Die Entwicklung einer quantitativen Bestimmungsmethode führte zu Schwierigkeiten wegen der relativen Instabilität des Methyl-Elenolactams. Das nach Reduktion von Methyl-Elenolactam mit Natriumborhydrid erhaltene Produkt zeigt dc ein echten Alkaloiden typisches Fließverhalten auf der DC-Platte.

4. Außer mit Methylamin wurden mit Ethyl-, Propyl-, Benzyl- und Phenylethylamin sowie mit Tyramin, Dopamin, Tryptamin und Serotonin Elenolactame erhalten. Diese wurden dc charakterisiert.

5. Zur Anreicherung des Reaktanden zur Elenolactam-Bildung wurden verschiedene chromatographische Verfahren eingesetzt: DC und SC an Kieselgel sowie SC an Dextrangel, Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie mit Reverse-Phase-Säule und präparative Reverse-Phase-Chromatographie mit Fertigsäulen. Gute Ergebnisse wurden mit der Droplet-Counter-Current- (Tropfen-Gegenstrom-Verteilungs-) Chromatographie erzielt. Als Reaktand zur Bildung der Elenolactame wurde Elenolsäure identifiziert und über DCCC rein gewonnen. Dabei zeigte sich, daß Elenolsäure keine einheitliche Substanz ist. Es wird vorgeschlagen, von Elenolsäure-Komplex zu sprechen.

6. Die Herkunft der Elenolsäure aus dem in Olea-Blättern enthaltenen Estersecoiridoidglukosid Oleuropein wurde untersucht. Durch Hydrolyse der Blattdroge bei pH 1 und 100°C wird Oleuropein vollständig zu Elenolsäure hydrolysiert. Hydrolyse bei 37°C im gleichen Medium führt lediglich zur Spaltung des Glykosids. Bei der Reaktion mit Methylamin wurden dc Dragendorff-positive Produkte gefunden, die nicht mit den Elenolactamen identisch sind.

7. Zur Bestimmung des Gehalts an Elenolsäure in der Droge vor und nach der Hydrolyse wurde eine photometrische Methode entwickelt, die auf der Bildung der p-Nitrophenylhydrazone der Elenolsäure beruht. Die höchsten Werte wurden nach einstündiger Hydrolyse erreicht und betragen über 1%, während Elenolsäure durch länger dauernde Hydrolyse weiter abgebaut wird.

8. In Abwesenheit des extrahierten Blattmaterials findet eine Elenolactam-Bildung in nennenswertem Umfang nicht statt, ebenso nicht, wenn die Blattmasse in Wasser erhitzt wird. Jedoch konnte die Bildung durch Zugabe von Eisen(III)-Salzen stimuliert werden. Der Einsatz von Meerrettich-Peroxidase sowie der Pyridinnucleotide NAD^+ und $NADP^+$ führte ebenfalls zur Elenolactam-Bildung. Daraus wurde geschlossen, daß die Bildung der Elenolactame durch die Wirkung

einer pflanzeneigenen Oxidase gefördert wird. Diese zeigte bei Hemmversuchen mit Cyanid, Fluorid und Azid sowie mit Hydrazin ein für Protoporphyrinenzyme typisches Verhalten.

9. Aus Versuchen zur Anreicherung des Enzyms mit verschiedenen Puffer- und Salz-Lösungen und mit cellulase- und pectinasehaltigen Extraktionsmedien wurde geschlossen, daß es sich bei der Olea-Oxidase um ein zellwandgebundenes Enzym-Gemisch mit unterschiedlicher Bindungsfestigkeit an unlöslichen Biopolymeren handelt.

10. Untersuchungen zur Kinetik der Reaktion zeigten, daß sich die Ausbeute an Elenolactamen steigern läßt, wenn nach der Entfernung des Reaktionsprodukts aus dem Ansatz die Reaktion fortgeführt wird. Weitere Zugabe von Amin steigert nochmals die Ausbeute.

11. Die Untersuchung der Reaktionsprodukte nach Inkubationszeiten zwischen 7.5 Minuten und zwei Stunden erbrachte, daß Methyl-Elenolactam über mindestens 1 Zwischenprodukt gebildet wird. Dc wurden weitere 1 (-3) Produkte beobachtet, die während des weiteren Reaktionsverlaufs zugunsten von Methyl-Elenolactam verschwinden.

12. In Liguster-Blattextrakt, der nach Hydrolyse der Droge bei pH 1 und 100°C hergestellt wurde, wurde über 1% Elenolsäure gefunden, während nicht hydrolysierte Droge keine Elenolsäure lieferte. Liguster-Blattextrakt bildet mit Methylamin das gleiche Elenolactam wie Ölbaum-Blattextrakt.

13. In der Diskussion wird erörtert, daß die Elenolsäure neben Secologanin ein weiterer monoterpenoider Baustein der China- und Indolalkaloide sein könnte. Möglicherweise ist die Reaktivität der Elenolsäure mit Aminogruppen der Grund der physiologischen Wirkungen der Droge: Die Senkung des pathologisch erhöhten Blutdrucks und eine unspezifische Wirkung gegen Viren.

10. EXPERIMENTELLER TEIL

10.1 Extraktbereitung und Drogenstandardisierung

Zur Untersuchung kamen Folia Oleae conc. der Firma Klenk aus Schweinfurt (Nr.8124) sowie selbst gesammelte Ölbaumblätter aus Umbrien und der Toskana.

10.1.1 Herstellung von gereinigtem Olea-Extrakt

Die Droge wurde in einer Retsch-Schneidemühle grob gepulvert (Siebdurchmesser 2 mm). Je 1000 g Droge wurden mit 2 l Ethanol 50 % gleichmäßig durchfeuchtet und mit 1 l Ethanol 50 % in eine Säule mit Fritte und Hahn (Ø 92 mm, Höhe 800 mm) eingeschlämmt, so daß die Droge mit Flüssigkeit bedeckt war. Die Säule wurde zugedeckt und 24 Stunden stehen gelassen. Danach wurde der Extrakt abtropfen gelassen, bis kein Überstand mehr über der Droge war, die Droge mit Glaswolle abgedeckt, mit Glaskugeln beschwert und nun kontinuierlich mit Aqua destillata extrahiert. Insgesamt 5 l Extrakt wurden aufgefangen und im Vakuum bei 100°C Wassertemperatur auf etwa 1 l eingeengt. Anschließend wurde zentrifugiert und der ölige schwarze Rückstand verworfen. Der klare braune Extrakt wurde auf eine Säule mit 1.5 kg Aluminiumoxid neutral (Woelm), desaktiviert mit 15 % Wasser (Brockmann) gegeben (Ø 92 mm, Höhe 600 mm, mit Fritte und Hahn). Nach dem Einsickern der Flüssigkeit wurde die Oberfläche mit Glaswolle und Glaskugeln bedeckt und die Säule mit Aqua destillata gewaschen. 5 l Durchlauf wurden aufgefangen. Das gelb gefärbte Eluat wurde im Vakkumverdampfer auf dem Wasserbad bei 100°C eingeengt, so daß 1 ml Extrakt 1 g Droge entsprach. Das Endprodukt war ein klare brauner Extrakt von aromatischem Geruch und stark bitterem Geschmack, pH-Wert ca. 6.

10.1.2 Herstellung von Extrakt zur Gewinnung der Elenolsäure

500 g grob gepulverte Droge werden mit 2 l HCl/KCl-Puffer

pH 1 (1940 ml 0.2 N-HCl und 1000 ml 0.2 N-KCl-Lösung werden zu 4000 ml mit Wasser aufgefüllt) im 4 l Rundkolben im Heizpilz 1 Stunde lang unter Rückfluß gekocht. Der gesamte Ansatz wird nach dem Abkühlen in eine Säule geschlämmt (s.o.) und der Extrakt abtropfen gelassen. Die Droge wird mit Aqua destillata nachgewaschen, bis insgesamt 5 l abgetropft sind. Der Extrakt wird im Vakuum auf 1 l konzentriert und mit 1 N-NaOH neutralisiert. Weiterverarbeitung über Al_2O_3-Säule wie bei gereinigtem Olea-Extrakt. Das Eluat wird auf 500 ml eingeengt, mit 6 N-HCl auf pH 1.5 gebracht und im Perforator mit 500 ml Dichlormethan 48 Stunden lang extrahiert. Die Wasserphase wird verworfen, die Dichlormethanphase im Vakuum zur Trockne gebracht und in 250 ml heißem Wasser aufgenommen. Nach dem Abkühlen wird filtriert, mit 6 N-HCl auf pH 1.5 eingestellt und 48 Stunden lang mit Diethylether perforiert. Die Wasserphase wird verworfen, die Etherphase zur Trockne eingeengt und bis zur Weiterverarbeitung in 10 ml Dichlormethan aufgenommen. 1 ml Extrakt entspricht 50 g Droge.

10.1.3 Aufbereitung der Droge und Gewinnung von Acetonpulver

Zur Aufbereitung der Droge siehe Seite 10, 2.1; zur Gewinnung von Acetonpulver Seite 60, 5.3.

10.2 Dünnschichtchromatographische Methoden

Adsorbentien: Die DC-Untersuchungen erfolgten auf Kieselgel-60 Fertigplatten mit Fluoreszenzindikator F_{254}, Schichtdicke 0.25 mm (Merck), zugeschnitten auf 10 x 10 cm. Die Platten wurden bei Raumtemperatur und Kammersättigung entwickelt, Laufhöhe 8 cm.
Fließmittel: Siehe bei den einzelnen Versuchsbeschreibungen.
Detektionsmittel: UV-Licht 254 und 365 nm und Sprühreagenzien:
Dragendorff-Reagenz (mod. nach Munier und Macheboeuf)
Vorratslösung: 850 mg Wismutsubnitrat werden in einer Mischung aus 40 ml Wasser und 10 ml Eisessig angeschüttelt, 8 g Kaliumiodid werden in 20 ml Wasser gelöst und hinzugegeben. Es

entsteht eine klare Lösung. Zum Besprühen werden 1 Teil der Vorratslösung, 1 Teil Eisessig und 3 Teile Wasser gemischt. Positive Reaktion: Orangerote Flecke auf gelblichem Untergrund.

DNPH-Eisessig-Salzsäure-Reagenz (nach Stahl)

In einem Gemisch aus 40 ml Eisessig, 40 ml 25 %iger Salzsäure und 20 ml Methanol werden 0.2 g 2.4-Dinitrophenylhydrazin gelöst. Nach Besprühen wird die Farbreaktion (gelb bis orange Flecke) bei Raumtemperatur ausgewertet.

Anisaldehyd-Schwefelsäure

Sprühlösung: Frisch bereitete Lösung von 0.5 ml Anisaldehyd in 50 ml Eisessig unter Zusatz von 1 ml Schwefelsäure (konz.).
Nachbehandlung: Auf 100-105°C erwärmen bis zur maximalen Farbintensität der Flecken.

Silbernitrat-Ammoniak (Tollens oder Zaffaronis Reagenz)

Lösung a: 0.1 N-Silbernitrat-Lösung,
Lösung b: 5 N-Ammoniak-Lösung.
Sprühlösung: Bei Bedarf werden 1 Teil a mit 5 Teilen b gemischt.
Nachbehandlung: 5 - 10 Minuten auf 105°C erwärmen bis zur maximalen Dunkelfärbung der Flecken. Lösung darf nicht aufbewahrt werden, da sich explosives Silberazid bilden kann.

Anilinphthalat-Lösung

Sprühlösung: 0.93 g Anilin und 1.66 g o-Phthalsäure werden in 100 ml wassergesättigtem Butanol gelöst.
Nachbehandlung: 10 Minuten auf 105°C erwärmen.

Diazotierte Sulfanilsäure (Paulys Reagenz)

Sprühlösung: 4.5 g Sulfanilsäure werden in 45 ml 12 N-Salzsäure unter Erwärmen gelöst und die Lösung mit Wasser au 500 ml verdünnt. 10 ml der verdünnten Lösung werden im Eisbad gekühlt und 10 ml einer kalten Natriumnitrit-Lösung (4.5 % in Wasser) hinzugefügt. Man hält die Mischung 15 Minuten bei 0°C und setzt kurz vor dem Besprühen das gleiche Volumen einer Natriumcarbonat-Lösung (10 % in Wasser) zu.

Dipikrylamin

Sprühlösung: 0.2 g Dipikrylamin werden in einem Gemisch aus 50 ml Aceton und 50 ml Wasser gelöst.

Ehrlichs Reagenz
Sprühlösung: 0.25 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd werden in einer Mischung von 25 ml Salzsäure (36 %) und 75 ml Methanol gelöst.
Eisen(III)-chlorid
Sprühlösung: Eisen(III)-chlorid-Lösung 5 % in 0.5 N-HCl.
Salpetersäure
10 ml Ethanol werden mit 5 Tropfen HNO_3 (65 %) versetzt; erhitzen auf 120°C.
Kaliumpermanganat
0.05 %ige Kaliumpermanganat-Lösung in Wasser
Ninhydrin
200 mg Ninhydrin in 80 ml Isopropanol werden mit 20 ml Wasser, das 2.5 g Natriumacetat enthält, gemischt.

10.3 Methoden zum Nachweis und zur Gewinnung der Elenolactame

10.3.1 Methyl-Elenolactam

10.3.1.1 Standard-Reaktion zum Nachweis

Die Reaktionsbedingungen wurden auf den Seiten 10 und 11 (2.2) ausführlich beschrieben. Die Auftrennung erfolgte auf mit Natriumacetat imprägnierten Platten: 200 mg Natriumacetat werden in 10 ml Wasser gelöst und zu 100 ml mit Aceton versetzt. Die Platten werden kurz in der Lösung geschwenkt, an der Luft trocknen gelassen und anschließend 10 Minuten bei 105°C im Trockenschrank aktiviert; Abkühlung und Aufbewahrung im Exsiccator.
Fließmittel für die Auftrennung
Vorversuche: Benzol/Rotisol 8:2, NH_3-Atmosphäre
Hauptversuche: Toluol/Rotisol 75:25 und 7:3.

10.3.1.2 Darstellung und Isolierung

100 ml gereinigter Olea-Extrakt wurden auf 800 ml mit Wasser verdünnt und 5 ml Methylamin-Lösung (35 - 40 %), 6 ml Eisessig und 25 g Acetonpulver hinzugefügt. Der Ansatz wird 1 Stunde lang bei 37°C gerührt (Magnetrührer, Heizplatte mit Kontakt-

thermometer im Reaktionsansatz). Nach Abschluß der Reaktion wurde vom Acetonpulver abzentrifugiert, filtriert und je 200 ml portionsweise mit je 3 x 100 ml Dichlormethan ausgeschüttelt; die Dichlormethanphase wurden vereinigt. Die wäßrige Phase wurde im Vakuum auf 200 ml konzentriert und noch einmal mit 3 x je 100 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten Dichlormethanphasen wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum das Dichlormethan entfernt. Es resultierten etwa 500 mg öliges, hellbraun gefärbtes Produkt, das säulenchromatographisch über Kieselgel aufgetrennt wurde. Glassäule Ø 75 mm, Höhe 400 mm; 150 g Kieselgel 60, Korngröße 0.063 - 0.200 (Merck) wurden in 300 ml Fließmittel (Toluol/Rotisol 75:25) eingeschlämmt und das überstehende Fließmittel bis auf 0.5 cm Überstand abgelassen. Das Reaktionsprodukt aus 125 g Droge wurde in 10 ml Fließmittel gelöst und mit einer Pipette vorsichtig auf den Überstand über der Säule aufgetragen. Nach dem Einsickern der Probe wurde vorsichtig Fließmittel aufgefüllt und kontinuierlich eluiert. Elutionsgeschwindigkeit 12 Tropfen/Minute = ca 15 ml/Stunde. Nach ca. 700 ml Vorlauf erschien das Reaktionsprodukt im Eluat; es ergaben sich ca 25 Fraktionen, die dc überprüft wurden. Die gelben Fraktionen wurden zur Trockne gebracht und dc über Kieselgel weiter gereinigt. Zur Auftrennung wurden selbstgegossene Kieselgelplatten benutzt, Plattengröße 20 x 20 cm, Schichtdicke ca. 5 mm.

Herstellung der Platten

10 g Kieselgel PF_{254} für präparative Schichtchromatographie (Merck) wurden in 25 ml Wasser angeschüttelt und auf die mit Aceton gereinigten Platten ausgegossen. Die Platten wurden über Nacht liegend trocknen gelassen und am nächsten Tag 1 Stunde lang bei 120°C im Trockenschrank aktiviert. Die gelben Fraktionen von der Säule wurden in wenig Ethanol 96 % gelöst, strichförmig aufgetragen und mit dem gleichen Fließmittel wie bei der Säulenchromatographie entwickelt (Laufhöhe 10 cm, dreimaliges Durchlaufen des Fließmittels).
Die Methyl-Elenolactam-Zonen wurden im UV-Licht bei 365 nm markiert und anschließend abgehoben. Die Elution aus dem Kieselgel erfolgte mit Ethanol 96 % im Ultraschallbad, an-

schließend wurde abzentrifugiert und filtriert. Das Eluat wurde im Vakuum zur Trockne gebracht und in 5 ml 0.5 N-Ammoniak-Lösung aufgenommen. Anschließend wurde 5 x mit je 5 ml Chloroform ausgeschüttelt, bis die Wasserphase farblos war. Die Chloroformphasen wurden vereinigt, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum das Chloroform entfernt. Der Rückstand wurde in der Wärme in wenig absolutem Ethanol aufgenommen und stehengelassen. Beim Abkühlen, zunächst bei Raumtemperatur, dann über Nacht im Kühlschrank, kristallisierten gelbe Nadeln aus. Diese wurden über Phosphorpentoxid getrocknet.

10.3.1.3 Reduktion von Methyl-Elenolactam

Dem Standard-Ansatz zur Bildung von Methyl-Elenolactam wurde nach 1 Stunde Reaktionszeit 1 ml 0.4 M-Natriumborhydrid-Lösung zugesetzt und drei bzw. sechzehn Stunden lang einwirken gelassen. Die weitere Aufarbeitung des Ansatzes erfolgte wie vorstehend beschrieben.

10.3.1.4 Versuche zur quantitativen Bestimmung

Die Versuche zur Ermittlung der Eichgeraden von Methyl-Elenolactam erfolgten mit einer 0.1 %igen Lösung (4.255 M) in Methanol/0.3 N-NH_4OH. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden von der Stammlösung 5, 10, 15, 20 und 25 µl zu 3 ml mit Methanol/0.3 N-NH_4OH verdünnt und direkt gegen das Lösungsmittel bei 356 nm gemessen. Die gefundenen Meßwerte ergaben bei graphischer Darstellung eine Gerade.

Methyl-Elenolactam Konzentration µg (mM)/3 ml	Mittelwerte n = 20	Niedrigst- bzw. Höchstwerte
5 (0.007092)	0.180	0.171 - 0.169
10 (0.014183)	0.360	0.332 - 0.400
15 (0.021274)	0.554	0.543 - 0.559
20 (0.028366)	0.738	0.652 - 0.778
25 (0.035457)	0.958	0.912 - 1.006

Für den Vergleich mit Pikrinsäure wurden die Extinktionswerte auf mM umgerechnet:

mM	Extinktion
0.01	0.262
0.02	0.524
0.03	0.781
0.04	1.042

Molarer Extinktionskoeffizient
ε = 26200 (c = Mol/l);
log ε = 4.4183
Spezifischer Extinktionskoeffizient $E^{1\%}_{1cm}$ = 1115 (c = %).

Da Methyl-Elenolactam im Reaktionsansatz bestimmt werden sollte, war eine Abtrennung von den übrigen Bestandteilen der Chloroformausschüttelung über DC erforderlich. Darum wurde eine Eichkurve mit gleichen Konzentrationen nach DC-Durchlauf erstellt.
Materialien: DC-Fertigplatten Kieselgel 60 ohne Fluoreszenzindikator 20 x 20 cm Merck; Fließmittel Toluol/Rotisol 7:3, die Platten wurden vor der Bestimmung einmal mit Fließmittel entwickelt. Die entsprechende Menge wurde 1 cm lang strichförmig aufgetragen (Microcaps 5 µl), Laufstrecke 8 cm. Eine Kieselgelfläche von 3 x 2 cm um Methyl-Elenolactam wurde abgehoben und in 3 ml Lösungsmittel in Schliff-Zentrifugengläschen im Ultraschallbad extrahiert, scharf abzentrifugiert und sofort gegen Lösungsmittel, mit dem eine gleiche Fläche Kieselgel ohne Methyl-Elenolactam extrahiert wurde, gemessen. Die Werte nach dem Auftrennen über Kieselgel lagen über 30 % (34 - 39 %) unter den Werten der direkt gemessenen Lösung.
Die Ermittlung der Eichkurve für Pikrinsäure erfolgte mit einer 0.1 mM Stammlösung (2.29 mg/100 ml). 1,2,3 und 5 ml der Stammlösung wurden zu 10 ml gelöst. Die gefundenen Meßwerte zeigt nachfolgende Tabelle.

Pikrinsäure Konzentration mM/10 ml	Mittelwerte n = 9	Niedrigst- bzw. Höchstwerte
0.01	0.168	0.156 - 0.184
0.02	0.327	0.304 - 0.365
0.03	0.485	0.441 - 0.529
0.05	0.807	0.712 - 0.850

Molarer Extinktionskoeffizient ε = 16400, log ε = 4.2148
Spezifischer Extinktionskoeffizient $E^{1\%}_{1cm}$ = 716.
Die Wiederfindungsrate nach der Entwicklung über Kieselgelplatten wurde analog der bei Methyl-Elenolactam beschriebenen Methode ermittelt; es wurde eine 1:10 konzentrierte Stammlösung von Pikrinsäure verwendet. Die Wiederfindungsrate betrug für Pikrinsäure etwa 90 % (85 - 94 %).

10.3.2 Benzyl-Elenolactam

Die Darstellung und Isolierung erfolgte analog der bei Methyl-Elenolactam beschriebenen Methode mit 5 ml Benzylamin (99 %). Das Reaktionsprodukt wurde nicht kristallisiert.

10.3.3 Andere Elenolactame

Zur Bildung der Elenolactame wurde der Standard-Ansatz mit entsprechenden molaren Mengen (0.065 M) von Ethylamin-Lösung 70 %, Propylamin, Phenylethylaminhydrochlorid, Tyraminhydrochlorid, 3-Hydroxytyraminhydrochlorid, Tryptamin und Serotoninhydrogenoxalat sowie L-Noradrenalin-L-tartrat (Monohydrat) umgesetzt (alle purissimum, Fa. Boehringer, Fluka, Merck und Roth). Die Reaktionsprodukte wurden nicht isoliert, sondern nur dc charakterisiert.

10.4 Methoden zum Nachweis und zur Gewinnung von Elenolsäure

10.4.1 Chromatographische Voruntersuchungen

Chromatographie an Kieselgel
Adsorbentien: DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254} und PSC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254}, Schichtdicke 2 mm (Merck).
Säulenfüllung: Kieselgel 60 Korngröße 0.063 - 0.200 (Merck).
Fließmittel: Toluol/Rotisol 75:25 und Aceton/Chloroform/Wasser 80:20:5.
Detektion: 2.4-DNPH-HCl-Eisessig-Reagenz (Stahl), s. S. 84.

Gelchromatographie

Säulenfüllung: Sephadex G-10 (Deutsche Pharmacia);
Fließmittel: Methanol 60 %/CH_3COOH 5 % (pH 3).
30 g Sephadex G-10 werden vorgequollen (DETERMANN 1967) und in eine Glassäule (Ø 2.3 cm, Höhe 30 cm) gefüllt. 1 ml gereinigter Olea-Extrakt wird mit 1.5 ml Fließmittel gemischt und vorsichtig auf die mit Watte abgedeckte Geloberfläche aufgetragen. Fraktionen á 10 ml werden aufgefangen. Die Fraktionen 1 und 2 sind stark gefärbt, aber Reaktand-frei. Fraktion 3 enthält den Hauptanteil des Reaktanden. Die Fraktionen 4 und 5 enthalten kaum noch Reaktanden neben Pigmenten. Auf diese Weise können etwa 50 % bezogen auf das Ausgangsgewicht abgetrennt werden (DETERMANN 1967, LATTANZIO 1977).

Reverse-Phase-Chromatographie

V o r u n t e r s u c h u n g e n

Gerät: High-Performance-Liquid-Chromatograph PERKIN ELMER Series 2; Einlaßteil Rheodyne 7105; Säule Reverse Phase C-8 Sil-X-10/409030 LC 25/4 mm.
Detektor: PE LC Spectrophotometric Detector, x = 256,
Schreiber: 88C Goertz Servogor 311, Papiervorscub 5 mm/min,
Fließmittel: I = Methanol 5 %/0.05 M-Phosphorsäure, II = Methanol 60 %/0.05 M-Phosphorsäure.
Extrakt entsprechend 1 g Droge (= Fraktion 3 von der Sephadex-Säule) wird eingeengt und in 1 ml Fließmittel I aufgenommen, 10 x je 100 µl werden eingespritzt; mit Fließmittel I wird eluiert, bis keine Peaks mehr aufgezeichnet werden, Durchflußgeschwindigkeit 2 ml/min, Trenndauer 90 min; mit Fließmittel II wird der Reaktand von der Säule eluiert (10 min).

H a u p t u n t e r s u c h u n g

Säule: Fertigsäule Lobar RP 8 24 cm/10 mm (LiChroprep RP 8, 40 - 63 µm) = Größe A.
Fließmittel: Siehe oben.
Die Säule wird bis zur völligen Sättigung mit Fließmittel I gewaschen; Extrakt entsprechend 1 g Droge (s. o.) wird in 1 ml Fließmittel aufgenommen und mit einer Vollglasspritze eingegeben. Die Elution mit Fließmittel I erfolgt über Nacht (16 h). Die so gewonnenen Fraktionen sind Reaktand-frei. Mit Fließmittel II kann der Reaktand von der Säule eluiert werden.

Die Detektion des Reaktanden erfolgte sowohl bei den Vor- als auch bei den Hauptversuchen mit der Standard-Reaktion mit Methylamin (s. 2.2). Verwendete Literatur: KUBECZKA 1970.

10.4.2 Hydrolyse von gereinigtem Olea-Extrakt

Hydrolyse mit Säure

Je 10 ml gereinigter Olea-Extrakt wurde mit 10 ml 1 N-HCl versetzt (pH-Wert des Gesamtansatzes 0.5) und 16 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen bzw. bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Anschließend wurde mit 6 N-NaOH neutralisiert (Glaselektrode) und mit jeweils 2 ml (entspr. 1 g Droge) die Reaktion mit Methylamin durchgeführt.

Jeweils der gleiche Reaktionsansatz wie oben wurde 5 und 10 Minuten sowie 1, 2 und 3 Stunden lang unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde wie oben mit 6 N-NaOH neutralisiert und mit je 2 ml die Standard-Reaktion durchgeführt.

Hydrolyse mit Base

10 ml gereinigter Olea-Extrakt wurde mit 10 ml 1 N-NaOH versetzt (pH-Wert des Ansatzes 12.5) und 16 Stunden bei 37°C geschüttelt. Danach wurde mit 6 N-HCl neutralisiert und mit 2 ml die Standard-Reaktion durchgeführt.

Als Vergleich diente bei allen genannten Versuchen die Reaktion von 1 ml unbehandeltem gereinigten Olea-Extrakt mit Methylamin.

Hydrolyse mit β-Glukosidase

1 ml gereinigter Olea-Extrakt wurde mit 9 ml einer Standard-Acetat-Pufferlösung (pH 4.66) versetzt, die 0.01 % Glukosidase (aus Mandeln) enthielt. Als Vergleiche dienten 10 ml Acetatpuffer (Blindversuch) und 1 ml Extrakt in 9 ml Acetatpuffer. Alle Ansätze wurden 16 h bei 37°C geschüttelt, ehe sie der Standard-Reaktion mit Methylamin zugeführt wurden.

Die Aufarbeitung der Ansätze nach der Reaktion mit Methylamin erfolgte wie bei 2. 2 beschrieben.

10.4.3 Isolierung von Elenolsäure aus Olea-Extrakt

Nachweis in gereinigtem Olea-Extrakt

25 ml gereinigter Olea-Extrakt wurden mit 6 N-HCl auf pH 1.5 eingestellt (Glaselektrode) und mit 100 ml Chloroform 24 Stunden lang perforiert. Die Chloroformphasen wurden im Vakuum auf 10 ml eingeengt und Diethylether zugegeben, bis kein Niederschlag mehr fiel (ca. 50 ml). Der Niederschlag wurde abfiltriert und in 25 ml Wasser gelöst. Der Chloroform-Ether-Überstand wurde im Vakuum zur Trockne gebracht und in 25 ml Wasser aufgenommen. Jeweils 5 ml der beiden Lösungen wurden der Standard-Reaktion mit Methylamin unterzogen. Die restlichen 20 ml Überstand-Lösung wurden zur Trockne eingeengt, in 5 ml Ethanol 96 % aufgenommen und dc auf Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator aufgetrennt. Fließmittel: Dichlormethan/Methanol/Wasser (mod. nach HOSTETTMANN 1980) 4:4:2. Nach dem Abtrocknen des Fließmittels konnten im UV-Licht bei 254 nm eine Haupt- und drei Nebenbanden detektiert werden (mittlerer - oberer Rf-Bereich). Die Hauptbande reagiert mit 2.4-DNPH-HCl-Eisessig-Reagenz gelb und mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz nach Erhitzen grau.

Gewinnung aus gereinigtem Olea Extrakt durch Droplet-Counter-Current-Chromatographie

Gerät: DCCC-A (Rikaki-Eyela Tokio); 12 Racks á 25 Säulen (= 300 Säulen); Länge der Säulen 400 mm, innerer Durchmesser 2 mm. Fließmittel: Chloroform/Methanol/n-Propanol/Wasser 5:6:1:4, stationäre Phase = Oberphase, mobile Phase = Unterphase (absteigende Methode). Verwendete Literatur: OTSUKA et al. 1978, HOSTETTMANN et al. 1978, 1979, 1980.

Der 500 g Droge entsprechende Dichlormethan-Extrakt (ca. 1 g) wurde in 10 ml stationärer Phase gelöst und eingefüllt. Die Auftrennung erfolgte in drei Durchgängen: 1. 20 min á 6 ml, 2. 10 min á 3 ml, 3. 3 min á 1 ml. Die Fraktionen wurden mit einem LKB-Fraktionssammler aufgefangen und dc untersucht. Nach den einzelnen Durchgängen wurden jeweils die Reaktandhaltigen Fraktionen vereinigt und die übrigen verworfen. Aus 1000 g Droge ohne Säurevorbehandlung wurden durchschnittlich 150 mg Reaktand isoliert, aus vorbehandelter Droge etwa das zehnfache.

10.4.4 Gewinnung von Elenolsäure aus Oleuropein

Isolierung von Oleuropein

Oleuropein, dc-rein: 40 g grob gepulverte Droge werden mit 200 ml Aceton 1 Nacht bei Raumtemperatur gerührt, filtriert und mit 100 ml Aceton nachgewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum fast zur Trockne gebracht und mit 100 ml Wasser digeriert. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und der wäßrige Überstand zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird in 20 ml Aceton aufgenommen und auf 40 g Kieselgel aufgebracht.
Säulenfüllung: Kieselgel 60 (s. o.), imprägniert mit 0.5 % Aluminiumchlorid in Methanol;
Fließmittel: Chloroform/Methanol 7:3
80 g Kieselgel mit $AlCl_3$ werden mit 50 % Fließmittel desaktiviertund in eine Glassäule (Höhe 400 mm, Ø 25 mm) eingefüllt, Höhe der Säulenfüllung ca. 250 mm. 10 g Extrakt-haltiges Kieselgel mit 5 ml Fließmittel werden trocken aufgetragen, mit ca. 1 cm Kieselgel abgedeckt und eluiert. Ab 80 ml Elutionsmittel kommt die Oleuropein-Fraktion (ca. 30 ml).
Oleuropein-Rohglykosid: Die Gewinnung erfolgt nach der im DAC beschriebenen Methode zur Gehaltsbestimmung.

Hydrolyse von Oleuropein

Da reines Oleuropein bereits nach kurzer Zeit zersetzt wird, wurde für die Versuche das relativ stabile Oleuropein- Rohglykosid verwendet. Dieses war zwar verunreinigt, aber Elenolsäure-frei.
Jeweils 10 mg Oleuropein-Rohglykosid (entspr. etwa 1 g Droge) wurden wie folgt behandelt:
Lösung in 10 ml Wasser, Inkubation für 1 Stunde bei 37°C (1), Lösung in 10 ml HCl/KCl-Puffer pH 1, Inkubation für 1 Stunde bei 37°C (2),Lösung in HCl/KCl-Puffer pH1, 1 Stunde lang unter Rückfluß gekocht (3), Lösung in 9 ml HCl/KCl-Puffer pH 1 + 1ml gereinigter Olea-Extrakt, 1 Stunde Inkubation bei 37°C (4), Lösung in 9 ml HCl/KCl-Puffer pH 1 + 1 ml Ger. Olea-Extrakt, 1 Stunde unter Rückfluß gekocht (5). Danach wurden alle Ansätze außer (1) mit 4 x 5 ml Diethylether ausgeschüttelt, die Etherphasen zur Trockne gebracht und in jeweils 10 ml Wasser aufgenommen. Anschließend wurde mit allen Ansätzen

die Reaktion mit Methylamin durchgeführt und die Reaktionsprodukte zur DC aufbereitet. Als Vergleiche dienten unbehandelter Olea-Extrakt und unbehandeltes Oleuropein.
Die Ansätze (2) und (3) wurden wiederholt und die Rückstände der Ether-Auschüttelung in 100 µl Ethanol aufgenommen, sie wurden direkt dc untersucht. Fließmittel: DCCC-Unterphase, Detektion: 2.4-DNPH-HCl-Eisessig-Reagenz.
Hydrolyse von Oleuropein in künstlichem Magensaft: 10 mg Oleuropein werden in 10 ml künstlichem Magensaft USP XX bei 37°C für eine Nacht (16 h) inkubiert. Danach wird mit Diethylether ausgeschüttelt und der Ansatz wie oben aufbereitet.

TTC-Sprühreagenz: (DAC-Codex R 85) 1 g Triphenyltetrazoliumchlorid (R 460 DAB 7) und 4 g NaOH (R Ph. Eu. I) werden in Methanol ad 100 ml gelöst.

10.4.5 Bildung der Hydrazone

2.4-Dinitrophenylhydrazon
Die Umsetzung erfolgte nach dem bei WINTERFELD angegebenen Verfahren. Reagenz: 1 g 2.4-DNPH + 12 ml Phosphorsäure 85 % + 8 ml Ethanol 95 %.
108 mg Elenolsäure aus DCCC-Gewinnung werden in 4 ml Ethanol 95 % gelöst und mit 2.9 ml Reagenz versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Sofort nach Zugabe des Reagenz findet eine Fällung statt. Der Niederschlag wurde dc untersucht.
Phenylhydrazon
Die Umsetzung erfolgte nach der bei PANIZZI angegebenen Methode. 80 mg Elenolsäure aus DCCC-Gewinnung und 10 mg Calcium-Elenolat wurden in 5 bzw 1 ml Wasser gelöst und mit 80 mg Phenylhydrazin-HCl bzw. 10 mg, in der gleichen Menge Wasser gelöst, umgesetzt. Sofort fand bei beiden Ansätzen eine weiße Fällung statt. Die Ansätze wurden über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag abzentrifugiert. Die Niederschläge wurden in wenig abs. Ethanol unter Erwärmen gelöst. Beim Abkühlen und Stehenlassen über Nacht kristallisierten weiße seidenglänzende Blättchen aus.

p-Nitrophenylhydrazon

Die Umsetzung erfolgte nach dem bei BAUER-MOLL angegebenen Verfahren.

100 mg Elenolsäure wurden in 100 ml CH_3COOH 12 % gelöst und mit 126.5 mg p-NPH in 120 ml Essigsäure 30 % versetzt. Der Ansatz wurde 5 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen, danach abzentrifugiert und mit CH_3COOH 10 % gewaschen, bis das Waschwasser mit Ethanol keine Trübung mehr zeigte. Die Kristalle wurden bei 105°C im Trockenschrank getrocknet.

10.5 Versuche zur quantitativen Bestimmung der Elenolsäure

Bestimmung von Calcium-Elenolat

Die Untersuchungen wurden mit verschiedenen Stammlösungen von Calcium-Elenolat durchgeführt, Lösung I 5 mg/100ml N-HCl (4 verschiedene Lösungen) und Lösung II 10 mg/100 ml N-HCL (2 verschiedene Lösungen).

Die Reaktion mit p-NPH-Reagenz (0.1 % in N-HCl) erfolgte in 10 ml Zentrifugengläsern, die mit Parafilm verschlossen wurden. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wurde gegen 1 ml Reagenz in 10 ml N-HCl gemessen.

Messungen mit Stammlösung I n = 4, jeweils Doppelbestimmungen

Konz. Ca-El. mg/10 ml	ml Stammlösung I/II	ml N-HCl I/II	ml Reagenz
0.05	1/0.5	8/8.5	1
0.1	2/1	7/8	1
0.2	4/2	5/7	1
0.3	6/3	3/6	1
0.4	8/4	1/5	1
0.5	/5	/4	1
0.6	/6	/3	1
Kontrolle	0	9	1

Bestimmung von Elenolsäure-Komplex in Olea-Extrakten

Extraktherstellung und Vorbereitung zur Messung:

1 g grob gepulverte Droge wird mit 25 ml Wasser bzw. HCl/KCl-Puffer pH 1 1 Stunde in einem 100 ml-Rundkölbchen im Heizpilz unter Rückfluß gekocht. Der gesamte Ansatz wird in ein 50 ml Meßkölbchen überführt, der Rundkolben mit Wasser nachgewaschen, das Waschwasser mit dem Ansatz vereinigt und zu 50 ml aufgefüllt. Das Meßkölbchen wird verschlossen und umgeschüttelt. Nach dem Absetzen der Droge (etwa 5 min) werden 10 ml in ein 25 ml Meßkölbchen abpipettiert, mit Wasser zur Marke aufgefüllt und umgeschüttelt. Anschließend wird tropfenweise mit 6 N-NaOH auf pH 5 - 6 (Glaselektrode) eingestellt und der Ansatz über 5 g Aluminiumoxid neutral, desaktiviert mit 15 % Wasser, gegeben, die sich in einer unten mit Watte verschlossenen Glassäule von 1 cm Durchmesser und 150 mm Höhe befinden. Um ein Aufwirbeln des Adsorbens zu vermeiden, wird mit Glaswolle abgedeckt. Nach dem Einsickern wird mit Wasser nachgewaschen; das Eluat wird in einem 50 ml Meßkolben bis zur Marke aufgefangen. Von diesen 50 ml werden 2 x je 10 ml (Doppelbestimmung) in 25 ml Weithals-Erlenmeyer-Kölbchen pipettiert und mit 6 N-HCl tropfenweise auf pH 1 - 2 (Glaselektrode) gebracht. Anschließend wird jeweils 4 mal mit je 10 ml Diethylether peroxidfrei im 50 ml Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die Etherphasen werden jeweils vereinigt und mit Na_2SO_4 sicc. getrocknet. Der Ether wird im Vakuum abgezogen. Die Rückstände werden in je 10 ml N-HCl aufgenommen, jeder Ansatz wird in zwei Teile geteilt: 5 ml werden mit 4 ml N-HCl versetzt und 1 ml p-NPH-Reagenz hinzugefügt = a; 5 ml werden zu 10 ml mit N-HCl aufgefüllt (Kontrolle) = b.

Nach zwei Stunden Reaktionszeit wird a gegen 1 ml Reagenz in 10 ml N-HCl = E_x und b gegen 10 ml N-HCl = E_0 bei 400 nm gemessen. E_x entspricht der Absorption des Elenolsäure-Komplexes in der Droge einschließlich der Absorption des Extrakts, E_0 entspricht der Absorption des Extrakts allein. $E_x - E_0$ ergibt die Extinktion des Elenolidsäure-Komplexes E_{EK}.

$$E_{EK} = E_x - E_0$$

Auf der Eichgeraden für Calcium-Elenolat kann die entsprechende Konzentration anhand der gefundenen Extinktion direkt abgelesen werden, berechnet als Calcium-Elenolat:

$$c_{EK} = c_V \times \frac{E_{EK}}{E_V}$$

c_{EK} = Konzentration der Untersuchungslösung, c_V = Konzentration der Vergleichslösung, E_{EK} = Extinktion der Untersuchungslösung, E_V = Extinktion der Vergleichslösung. Die gefundene Extinktion bezieht sich auf die Konzentration an Elenolsäurekomplex in 0.04 g Droge.

10.6 Untersuchung der Wirksamkeit einzelner Oxidantien

10.6.1 Einsatz verschiedener Oxidantien

Die Untersuchungen wurden mit dem Standard-Ansatz durchgeführt. Zur Untersuchung kamen jeweils 1 ml gereinigter Olea-Extrakt bzw.1 mg Calcium-Elenolat.
Anstelle von extrahierter Droge und Kaliumhexacyanoferrat(III) kamen zur Anwendung:
Extrahierte Droge bzw. Acetonpulver 0.25 g,
Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung 20 % 50 µl,
Meerettich-Peroxidase 5 µl (Boehringer)
NAD 5 mg, NADP 5 mg (Boehringer).

10.6.2 Untersuchungen zur Charakterisierung der Olea-Oxidase

Die Versuchsanordnung wurde unter 5.2 ausführlich beschrieben.

10.6.3 Versuche zur Anreicherung der Olea-Oxidase

5 g grob gepulverte Droge wurde in 50 ml kaltem 0.1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7 mit dem Ultraturrax extrahiert. Anschließend wurde noch 2 Stunden im Kühlschrank gerührt. Der Ansatz wurde 20 Minuten bei 5°C und 15000 g zentrifugiert.

Der Rückstand wurde in 5 Volumenteilen kaltem Puffer 5 mal suspendiert und wieder niedergeschlagen, anschließend wurden 200 mM Calciumchlorid hinzugefügt und 2 Stunden lang bei 5°C gerührt. Der Ansatz wurde wirder 20 Minuten bei 5°C und 15000 g zebtrifugiert.
Der Rückstand wurde mit 50 ml einer Lösung von 2.5 % Pectinase und 0.5 % Cellulase (Rohament P und Cellulase 2230 A, Röhm) in 0.05 M-Natriumacetat-Puffer pH 5.5 suspendiert und 24 Stunden lang bei 30°C inkubiert. Danach wurde wieder bei 5°C und 15000 g zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde als "Enzymlösung" eingesetzt.
Die Versuche wurden mit der gleichen Versuchsanordnung, aber jeweils nur mit Cellulase bzw. Pectinase allein wiederholt. Die Inkubation mit der Cellulase/Pectinase-Lösung erfolgte über 24, 48 und 60 Stunden.

10.7 Untersuchungen zur Kinetik der Standard-Reaktion

Versuchsbeschreibung siehe unter 6.

10.8 Nachweis von Elenolsäure in Ligustrum vulgare L.

Die Darstellung und Untersuchung der Reaktionsprodukte von Liguster-Extrakt mit p-NPH und Methylamin erfolgte analog den Verfahren zur Gewinnung der Reaktionsprodukte von Olea-Extrakt mit den beiden Reagenzien.

10.9 Physikalische Untersuchungsmethoden

Schmelzpunkte
Die Schmelzpunkte der Substanzen wurden nach dem Trocknen im Vakuum über Phosphorpentoxid mit dem Kofler-Mikroheiztisch der Fa. Reichert bestimmt. Die Werte sind unkorrigiert angegeben.
UV/VIS-Spektren
Die Spektren wurden mit einem Spektralphotometer Graphicord UV 240 der Firma Shimadzu aufgenommen. Die quantitativen Bestimmungen erfolgten auf dem gleichen Photometer.

Infrarot-Spektren

Für die Aufnahme der IR-Spektren wurde ein Spektralphotometer 257 der Firma Perkin Elmer verwendet. Von den Substanzen wurden KBr-Presslinge hergestellt.

Massenspektren

Die Massenspektren wurden mit einem Finnigan Mat 212 mit SS 188 im Institut für Pharmazeutische Chemie aufgenommen.

^{1}H-NMR-Spektren

Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit dem Bruker WH-90 des Instituts für Pharmazeutische Chemie. Die Untersuchungen wurden in Deuterochloroform mit TMS als innerem Standard aufgenommen.

Elementaranalyse

Die CH-Analyse wurde im Institut Chemie für Mediziner im Klinikum Niederrad mit einem Elementaranalyzer Modell 1104 der Firma Carlo Erba durchgeführt.

11. LITERATURVERZEICHNIS

BALANSARD, J. und J. DELPHAUT: La feuille d'olivier
Rev. Phytother. 17, 19/35 (1953)

BATTERSBY, A.R., A.R. BURNETT und P.G. PARSONS: Preparation of Secologanin: Its Conversion into Ipecoside and its Role in Alkaloid Biosynthesis
Chem. Comm., 1260 (1968)

BAUER, K.H. und H. MOLL: Die organische Analyse, 5. Auflage, 288, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig (1967)

BEGUIN: Thèse, Strasbourg (1816), zit. bei: JARDON

BEYERMAN, H.C., L.E. VAN DIJCK, J. LEVISALLES, A. MELERA und W.L.C. VEER: Structure de l'elenolide
Bull. Soc. Chim. Fr., 1812-1820 (1961)

BIANCO, A., M. GUISO, C. IAVARONE, R. MARINI-BETTOLO und C. TROGOLO: Reduction of Iridoid Aglucons - III
Tetrahedron Lett. 35, 1121-1123 (1979)

BIOCHEMICA INFORMATION I BOEHRINGER Mannheim: Peroxidase, 112-114 (1973)

BOBBITT, J.M. und K.-P. SEGEBARTH: The Iridoid Glycosides and similar Substances, in: Cyclopentanoid Terpene Derivatives; Taylor, W.I. und A.R. Battersby (Ed.) 1-146, Marcel Dekker, New York (1969)

BOCKOVA, H., J. HOLUBEK und Z. CEKAN: Inhaltsstoffe des Ölbaums; Coll. czech. chem. Commun. 29, 1484-1491, (1964)

BOURQUELOT, E. und J. VINTILESCO: Sur l'oleuropeine, nouveau principe de nature glucosidique retiré de l'olivier (Olea europaea L.); J. Pharm. Chim. (6) 28, 303 (1908)

BOURQUELOT , E. und J. VINTILESCO: Sur les variations des proportions d'oleuropeine dans l'olive depuis son apparation jusqu'à sa maturité; J. Pharm. Chim. (7) 1, 292 (1910)

BROWN, R.T. und C.L. CHAPPLE: Secologanine Aglycone; Tetrahedron Lett. 10, 787-790 (1976)

BROWN, R.T. und J. LEONARD: Conversion of Secologanine into Cinchona Alkaloids; J. Indian Chem. Soc. LV, 1092-1095 (1978)

BRÜCHER, H.: Tropische Nutzpflanzen; Springer Verlag Berlin (1977)

CANZONERI, G.: Nuove ricerche sulle foglie di ulivo; Gazz. Chim. Ital. 27, (1897) und 36, 372 (1906)

CAPUTO, R., L. MANGONI, P. MONACO und L. PREVITERA: New Triterpenes from the Leaves of Olea europaea L.; Phytochem. 13, 2825 (1974)

CAVANNA, D. und M. PIRONA: Azione ipotensiva delle foglie di Olea europaea; Boll. Chim. Pharm. 89, 3-8 (1950)

COHEN, S., A. LIFSHITZ und Z. SAMISHI: Determination of Bitterness of Olives; Journal of the AOAC 50, 1194-1195 (1967)

COHEN, S. und A. LIFSHITZ: Separation of a Bitter Principle from Olives; Journal of the AOAC 52, 310 (1969)

CORDELL, G.A.: The Biosynthesis of Indole Alkaloids; Lloydia 37, 219 (1974)

CRUESS, W.C. und C.L.ALSBERG: The Bitter Glucoside of the Olive; J. Amer. Chem. Soc. 56, 2115-2117 (1934)

DAC Deutscher Arzneimittel Codex: Folia Oleae; Ergänzungsbuch zum Deutschen Arzneibuch (1972-1978), Govi-Verlag, Frankfurt

DANIEL-BRUNET, A. und M. OLIVIERO: Principes de la feuille d'olivier et leur action physiologique; Bull. Acad. Med. 122, 191 (1939)

DAVIS, V.E. und M.J. WALSH: Alcohol, Amines, and Alkaloids: A possible Biochemical Basis for Alcohol Addiction; Science 167, 1005-1006 (1970)

DE NUNNO, R. und G. CAPRETTI: Action hypotensive des feuilles d'olivier; Prod. Pharm. 333 (1951)

DETERMANN, H.: Gelchromatographie; Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York (1967)

DIERBACH, J.H.: Der Ölbaum der Pallas Athene oder Minerva; Flora Mythologica (1870)

ELLIOTT, G.A., D.A. BUTHALA und E.N. DE YOUNG: Preliminary Safety Studies wirt Calcium-Elenolate, an Antiviral Agent; Antimicr. Agents Chemother. 2, 173-176 (1969)

EL-NAGGAR, L.J. und J.L. BEAL: Iridoids - A Review; Lloydia 43, 649-707 (1980)

ESDORN, I.: Folia Oleae, eine neue blutdrucksenkende Droge; Planta Med. 2, 145-148 (1954)

FAURE, E.: Usage médical des feuilles d'olivier dans le traitement des fièvres intermittents; Thèse Strasbourg (1814)

FERRAT: Essaie d'analyse des feuilles d'olivier, Olea europaea culta; Bull. de Pharm. X, 433 (1811)

FORD, J.H., F.A. MACKELLAR, P.A. MEULMAN, R.J. WNUK und G.C. PRESCOTT: Preparation of Calcium-Elenolate from Olive Press Juice; Org. Prep. Proced. Int. 4 (2), 97-104 (1972)

FRANKE, G.: Nutzpflanzen der Tropen und Subtropen; I; Hirzel Verlag Leipzig (1980)

FRIDOVICH, I.: The Stimulation of Horseradish Peroxidase by Nitrogenous Ligands; Journ. Biol. Chem. 238, 3921-3927 (1963)

GIBSON, D.M. und E.H. LIU: Inhibition of Cell Wall-Associated Peroxidase Isozymes with British Anti Lewisit; Journ. Exper. Bot. 32, 419-426 (1981)

HAGER'S HANDBUCH der Pharmazeutischen Praxis: Olea europaea 6. Band, 4. Neuaufl. Springer Verlag Berlin (1977)

HÄNSEL, R.: Glykosidische Bitterstoffe der Monoterpenreihe; Planta Med. 14, Suppl. 61-77 (1966)

HÄNSEL, R. L. BARTHEL und H. RIMPLER: Synthese des 3-Methyl-5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxy-flavanons: Zur Frage des Vorkommens von "Olivin" in Olivenblättern; Arch. Pharm. 303, 860-864 (1970)

HARBORNE, J.B. und P.S. GREEN: A Chemotaxonomic Survey of Flavonoids in Leaves of the Oleceae; Bot. Journ. Linn. Soc. 81, 155-167 (1980)

HEGI, G.: DXC. Olea L. Oelbaum; Illustrierte Flora von Mitteleuropa Band V/3. Teil 1934-1944, Hanser Verlag München (1966)

HEGNAUER, R.: Die Pseudoindikane der Dikotyledonen und einige ihnen nahestehende Verbindungen; Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. 3 29-34; Birkhäuser Verlag Basel (1964)

HEGNAUER, R.: Aucubinartige Glykoside; Pharm. Acta Helv. 41, 577-587 (1966a)

HEGNAUER, R.: Oleaceae; Chemotaxonomie der Pflanzen Bd. 5 231-247; Birkhäuser Verlag Basel (1969)

HEGNAUER, R. und P. KOOIMAN: Die systematische Bedeutung von iridoiden Inhaltsstoffen im Rahmen von Wettsteins Tubiflorae; Planta Med. 33 1-33 (1978)

HEINZE, J.E., A.H. HALE und P.L. CARL: Specifity of the Antiviral Agent Calcium-Elenolate; Antimicr. Agents Chemother. 8, 421-425 (1972)

HIRSCHMAN, S.Z.: Inactivation of DNA Polymerases of Murine Leukaemia Viruses by Calcium-Elenolate; Nature New Biol. 238, 277-279 (1972)

HOSTETTMANN, K, M. HOSTETTMANN-KALDAS und K. NAKANISHI: Droplet Counter-Current Chromatography for the preparative Isolation of Various Glycosides; Journ. Chromat. 170, 355-361 (1979)

HOSTETTMANN, K.: Tropfen-Gegenstrom Chromatographie; Chem. Rundsch. Nr. 47 (1980)

HOSTETTMANN, K.: Droplet Counter-Current Chromatography and its Application to the Preparative Scale Separation of Natural Products; Planta Med. 39, 1-18 (1980)

HUBER, G.: Zur Identitätsprüfung und Wertbestimmung der Cynara-, Olea- und Petasites-Drogen; Dissertation München (1975)

INOUYE. H., T. YOSHIDA, S. TOBITA, K. TANAKA und T. NISHIOKA: Absolute Struktur des Oleuropeins und einiger verwandter Glykoside; Tetrahedron Lett. 28, 2459-2464 (1970)

INOUYE, H.: Neuere Ergebnisse über die Biosynthese der Glukoside der Iridoid-Reihe; Planta Med. 33, 193-216 (1978)

JANKU, I., H. RASKOVA, O. MOTL und Z. BLAZEK: Zur blutdrucksenkenden Wirkung der Olivenextrakte; Arch. Int. Pharmacodyn. CXII, 342-347 (1957)

JARDON, P.: Contribution à l'étude chimique et pharmacodynamique de la feuille d'olivier; Thèse Lyon (1942)

KELLY, R.C. und I. SCHLETTER: Total Synthesis of dl-Methyl-Elenolate; J. Am. Chem. Soc. 95, (21) 7156-7157 (1973)

KLEINERT, W.: Chinaalkaloide in Olea europaea L.; Dissertation Frankfurt (1971)

KOSAK, R. und P. STERN: Pharmakologie des blutdrucksenkenden Prinzips der Olivenblätter; Planta Med. 7, 118-121 (1959)

KOSAK, R. und P. STERN: Zur Wirkungsweise des hypotensiven Prinzips der Olivenblätter; Arch. Exper. Path. Pharmakol. 238, 117-119 (1960)

KOSAK, R. und P. STERN: Einfluß eines wäßrigen Auszugs aus Olivenblättern auf den Kupferstoffwechsel der Ratte Arznm. Forsch. (Drug Res.) 12, 919-921 (1962)

KUBECZKA, K.-H.: Chromatographische Kombinationstechniken bei der Analyse von Naturstoffen; Planta Med. 35, 291-307 (1979)

KUHLMANN, J.: Herzglykoside; Dtsch. Apoth. Ztg. 121, 2281-2297 (1981)

LANDERER, X.: Ueber einen krystallinischen Stoff in den Olivenblättern; Rep. Pharm. 57, 205-209 (1836)

LANDERER, X.: Ueber die krystallinische Substanz in Oliven; Rep. Pharm. 72, 348-350 (1840)

LASSERRE, B., R. KAISER und P.H. CHANH: Effects on Rats of Aqueous Extracts of Plants used in Folk Medicine as Antihypotensive Agents; Naturwiss. 70, (2) 95-96 (1983)

LATTANZIO, V.: Determination of the polyphenolic active principles of Artichoke; Ind. Cons. 52, 316-320 (1977)

LECLERC, H.: Emploi de la feuille d'olivier dans le traitement de l'hypertension; Rev. Phytother. 8, 3-6 (1944)

MACKELLAR, F.a. und R.C. KELLY: Structure and Stereochemistry of Elenolic Acid; J. Am. Chem. Soc. 95, (21) 7155-7156 (1973)

MAHLER, H.R. und E.H. CORDES: Biological Chemistry 278-321, Harper and Row, New York (1967)

MAZET, G.: Application therapeutique de la feuille de l'olivier; Gaz. Med. Fr. (1938)

MECHOULAM, R., N. DANIELI und Y. MAZUR: The Structure and Synthesis of Oleuropeic Acid; Tetrahedron Lett. 16, 709-712 (1962)

MERAT und DE LENS: Traité de Matière médical; Paris 1833

MOTHES, K. und H.R. SCHÜTTE: Biosynthese der Alkloide; VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1969)

MURPHY, M.J. und C.O. HEOCHA: Peroxidase from the Red Algae Cystoclonium purpureum; Phytochem. 12, 55-59 (1973)

ORGANIKUM 12. Aufl., VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin (1973)

OTSUKA, H., S. KOBAYASHI und S. SHIBATA: Separation and Determination of Saponins of Bupleuri Radix by Droplet Counter-Current Chromatography; Planta Med. 33, 152-159 (1978)

PALLAS, O.: Analyse des feuilles d´olivier; Journ. Pharm. XIII, 604 (1827)

PANIZZI, L. M.L. SCARPATI und G. ORIENTE: Sulla costituzione delle Oleuropeina, glucoside amaro e ad azione ipotensiva dell´olivo Nota I; Ricerca Sci. 28, 994 -998 (1958)

PANIZZI, L. M.L. SCARPATI und G. ORIENTE: Dto. Nota II; Gazz. Chim. Ital. 90, 1449-1485 (1960)

PANIZZI, L., M.L. SCARPATI und C. TROGOLO: Sulla Oleuropeina Nota III; Gazz. Chim. Ital. 95, (11) 1279-1292 (1965)

PELLETIER, J.: Examen chimique d´une matière végétale proposée comme susceptible de remplacer quinquina; Journ. de Pharm. X, 453 (1823)

PETERS, U.: Klinische und pharmakologische Grundlagen für eine kontrollierte Digitalis-Therapie; Z. Kardiol. 69, 247-261 (1980)

PETKOV, V. und P. MANOLOV: Pharmakological Analysis of the Iridoid Oleuropein; Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 22, 1476-1486 (1972)

PINDUR, U.: Zur Reaktion von Tryptophan mit Aldehyden; Arch. Pharm. 311, 615-621 (1978)

PLOUVIER, V.: Sur l´étude biochimique comparées de quelques Oléacées; Compt. Rend. Acad. Sci. 227, 604-606 (1948)

PLOUVIER, V.: Nouvelles recherches sur le mannitol et le syringoside de quelques Oléacées; Compt. Rend. Acad. Sci. 234, 1577-1579 (1952)

POWER, F.B. und F. TUTIN: The Constituents of Olive Leaves; Trans. Chem. Soc. 93, 891 (1908)

RENIS, H.E.: In Vitro Antiviral Activity of Calcium-Elenolate; Antimicr. Agents Chemother. 2, 167-172 (1969)

RENIS, H.E.: Inactivation of Myxoviruses by Calcium-Elenolate; Antimicr. Agents Chemother. 8, 194-199 (1975)

REPETTO, M. und D. MARTINEZ: Über die Synthese eines Harman-ähnlichen Alkaloids; Anal. Quim. 1015 (1976)

RIKLI, M.: Der Ölbaum, das Wahrzeichen der Mittelmeerländer; Das Pflanzenkleid der Mittelmeerländer, Bd. 1, Huber Verlag Bern (1943)

RIMPLER, H.: Strukturaufklärung von Iridoidglykosiden; Planta Med. 33, 313-335 (1978)

ROTH, B.: Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie; Pharm. i. u. Z. 10, 50-59 (1981)

SAMUELSSON, G.: Der blutdrucksenkende Faktor in den Blättern von Olea europaea L.; Farm. Revy 50, 229 (1951)

SAUNDERS, B.C., A.G. HOLMES-STEDLE und B.P. STARK: Peroxidase; Butterworth, London (1967)

SCARPATI, M.L. und C. TROGOLO: 6-O-Oleuropeoylsucrose from Olea europaea; Tetrahedron Lett. 46, 5673 (1966)

SCHNEIDER, E.A. und F. WIGHTMAN: Metabolism of Auxin in higher Plants; Ann. Rev. Plant Phys. 25, 478-513 (1974)

SCHNEIDER, G. und W. KLEINERT: Chinaalkaloide in Ölbaumblättern; Naturwiss. 58, 524 (1971)

SCHNEIDER, G. und L. LÖBENBERG: Zur Morphologie und Anatomie der Olivenblätter; Planta Med. 22, (1974)

SCHWARZ, T.: Die Behandlung von Bluthochdruck-Erkrankungen mit Wirkstoffen aus Folia Olivae; Die Medizin. 41, 1387-1388 (1954)

SHASHA, B. und J. LEIBOWITZ: Oleuropeic Acid: a New Compound from Olea europaea; Nature 184, 2019-2020 (1959)

SHASHA, B. und J. LEIBOWITZ: On the Oleuropein, the Bitter Principle of Olives; J. Org. Chem. 26, 1948-1954 (1961)

SOLIMAN, S.A. und EL-S.A. EL-NENAY: Comparative Study of the Condensation of (-)-Ephedrine and Benzaldehyde; Pharmazie 33, 235 (1978)

SORET, M.G.: Antiviral Activity of Calcium-Elenolate on Para-

influenza Infection of Hamsters; Antimicr. Agents Chemother. 2, 160-166 (1969)

STAFFORD, H.A. und B. BRAVINDER-BREE: Peroxidase Isozymes of First Internodes of Sorghum; Plant Physiol. 49, 950-956 (1972)

STAHL, E.: Chromatographische und mikroskopische Analyse von Drogen; G. Fischer Verlag Stuttgart (1970)

STAMATIADIS, A.: Action hyoptensive des feuilles d'olivier; Prod. Pharm. 333 (1951)

STICHER, O. und U. JUNOD-BUSCH: Die Iridoidglykoside und ihre Isolierung; Pharm. Helv. Acta 50, 127-144 (1975)

STÖCKIGT, J.: Enzymatic Formation of Intermediates in the Biosynthesis of Ajmalicine: Strictosidine and Cathenamine; Phytochem. 18, 965-971 (1979)

STOFFLISTE: 5. Aufl., 60. Erg. Lief., Frankfurt Olea europaea L., 1145 (1972)

TIETZE, L.-F.: Secologanin, eine biogenetische Schlüsselverbindung - Synthese und Biogenese der Iridoid- und Secoiridoidglykoside; Angew. Chem. 95, 840-853 (1 (1983)

USP The United States Pharmacopeia, XX Rev. 1980

VAN DER HAAR, A.W.: Rec. Tra. Chim. Pays-Bas 43, 546 (1924)

VEER, W.L.C., V. GERRIS, J.E. RIBBERS, P.J. OUD und P.J. VAN REE: A Compound isolated from Olea europaea L.; Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 76, 839-840 (1957)

VEER, W.L.C.: Dutch 90.043 Jan. 15 (1959) Patentschrift; Ref. CA 54 3872 (1962) Preparing Elenolide and Elenolic Acid from Oleaceae

VEER, W.L.C.: U.S. 3.033.877 (Cl. 260-345.8) May 8, 1962, Neth. Appl. Feb.21, 1957 Patentschrift; Ref. CA 58 553 (1963) Esters and Salts of Elenolic Acid

VERPOORTE, R., M.G.L.M. VISSER und A.B. SVENDSEN: Flase- Positive Alkaloid-Reaction; Fitoter. LIV, (3) 127-131 (1983)

WINTERFELD, K.: Organisch-chemische Arzneimittelanalyse 6. Aufl. 1971, 28 (342) Steinkopff Verlag Darmstadt (1971)

WOODWARD, R. B., F.E. BADER, H. BICKEL, A.J. FREY und R.W. KIERSTEAD: The Total Synthesis of Reserpine; Tetrahedron 2, 1-57 (1958)

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Georg Schneider im Institut für Pharmazeutische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main angefertigt.

Meinem verehrten Lehrer und Doktorvater,
Herrn Professor Dr. Georg Schneider,
danke ich herzlich für die Themenstellung, seine wertvollen Ratschläge und stete Diskussionsbereitschaft, mit der er meine Arbeit unterstützt und gefördert hat.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Professor Dr. H. Linde, Institut der Pharmazeutischen Chemie der Universität Frankfurt/Main, für sein Entgegenkommen bei der Aufnahme und Auswertung der Massen- und ^{1}H-NMR-Spektren und für die hilfreichen Diskussionen; ebenso danke ich seinen Mitarbeitern Frau G. Cramer, Frau E. Roos und Herrn S. Bihler.

Herrn Dr. K. Gries, Firma Upjohn, Heppenheim, danke ich für die Beschaffung der Referenzsubstanz; der Firma Röhm, Darmstadt, für die Überlassung von Enzympräparationen.

LEBENSLAUF VON DOROTHEE HELMECKE

Geburtstag und -ort	18.06.1949 in Essen
Eltern	Rolf und Margret Helmecke, geb. Götte
Schulausbildung	1955 - 1959 Grundschule in Köln, Essen, Frankfurt 1959 - 1967 Realgymnasium St.- Angelaschule in Königstein Abitur am 21. Juni 1967
Berufsausbildung	1967 - 1969 Praktikum in der Bahnhof-Apotheke in Frankfurt-Höchst Vorexamen am 25. September 1969 in Wiesbaden Studium der Pharmazie: SS 1970 - WS 1970/71 Phil.-theol. Hochschule Bamberg SS 1971 - WS 1973/74 Philipps-Universität Marburg Staatsexamen am 6. Juni 1974 Approbation am 2. Juli 1974
Berufsweg	Juli - September 1974 Vertretungen in verschiedenen Apotheken Januar 1975 - Dezember 1977 Referentin für wissenschaftliche Information, Produktgruppe Antibiotika Medizinische Abteilung Hoechst AG Januar 1978 - Dezember 1982 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Pharmazeutische Biologie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main

1983 Vertretungen in verschiedenen Apotheken

Seit Februar 1984 Mitarbeiterin im Arzneibüro der Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände-ABDA

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren:

Böhme, Büsing, Ebel, Eger, Fasold, Fraunberger, Haake, Hartke, Haustein, Holleck, Kating, Kolb, List, Mutschler, Nultsch, Otto, Rosenmund, Schmitz, Schneider, Seitz, Walcher, Wichtl, Willuhn.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353